



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA
SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE INGENIERÍA QUÍMICA

**BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA DE CLOROFENOLES EN
AGUAS RESIDUALES**

TESIS DOCTORAL

DANIEL PUYOL SANTOS
MADRID, JUNIO DE 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTADO DE CIENCIAS
SECCIÓN DEPARTAMENTAL DEL INGENIERÍA QUÍMICA



**BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA DE CLOROFENOLES EN
AGUAS RESIDUALES**

MEMORIA

que para optar al grado de

Doctor

Presenta

Daniel Puyol Santos

Madrid, Junio de 2010

D. José Luis Sanz Martín, Catedrático de Universidad, profesor del Departamento de Biología Molecular, y **D. Ángel Fernández Mohedano**, Titular de Universidad, profesor del Departamento de Química Física Aplicada, ambos de la Universidad Autónoma de Madrid,

HACEN CONSTAR:

que el presente trabajo, titulado: “Biodegradación anaerobia de clorofenoles en aguas residuales”, presentado por D. Daniel Puyol Santos, ha sido realizado bajo su dirección, en los laboratorios de la Sección Departamental de Ingeniería Química y del Departamento de Biología Molecular, en la Universidad Autónoma de Madrid y que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que conste a efectos oportunos, firmamos el presente informe en Madrid, a 15 de junio de dos mil diez.

José Luis Sanz Martín

Ángel Fernández Mohedano

*A mi familia,
por tantos años de apoyo y dedicación,
sin ellos nunca podría haber llegado hasta aquí.*

*A mi madre,
de quien he heredado toda la entrega
que me ha permitido cumplir mis expectativas.*

*A Gema,
mi fuerza y la luz que me ha guiado
durante todos estos años.*

Quisiera agradecer:

Al Doctor José Luis Sanz Martín, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis, por su tutela y dirección durante estos años, por sus expertos consejos en una disciplina que yo apenas conocía. También quisiera agradecer al Doctor Ángel Fernández Mohedano, por su apoyo, sus opiniones y puntos de vista, y por darle a este estudio un enfoque técnico y aplicado. Además quisiera agradecer la confianza y el apoyo económico que depositó en mi durante estos años, sin los que nunca podría haber concluido esta Tesis.

Al Doctor Juan José Rodríguez Jiménez, por brindarme la oportunidad de haber trabajado en la Sección de Ingeniería Química, y por sus innumerables y expertos consejos y su dedicación, además de por su fino sentido del humor.

A Víctor Monsalvo, mi compañero de aventuras y desventuras durante todo este tiempo, por compartir experiencias en nuestras respectivas investigaciones, por su amistad y su ayuda en muchos momentos de la investigación.

A la Doctora Elena Díaz, mi otra compañera desde el inicio de nuestras Tesis, con quien hemos pasado agradables ratos juntos. También quiero agradecerle el gran esfuerzo que ha realizado para que muchos equipos analíticos del laboratorio C-VI estén en perfectas condiciones, y por la ayuda prestada en temas de cinética.

A todos mis compañeros de la Sección Departamental de Ingeniería Química. De todos he aprendido algo y habéis sido mi familia académica durante estos años. Quisiera agradecer de forma especial al Doctor José Antonio Casas, el que considero mi mentor académico, que sé que disfrutará leyendo esta Tesis; a la Doctora Asunción Quintanilla, por apoyarme de forma tan desinteresada en mis peores momentos; a la Doctora Zahara Martínez, por su simpatía y alegría; y a Luis Roper, nuestro técnico de laboratorio, por tener todos los aparatos a punto y todos los pedidos al día.

A la Doctora Nuria Fernández, al Doctor Emiliano Díaz y a Hayfa Rajhi, del Departamento de Biología Molecular, por su inestimable ayuda con las técnicas moleculares y con los cultivos anaerobios. También quiero agradecer al resto del laboratorio 101 por aceptarme como uno más.

A mis colegas alcorconeros/-as, por haber hecho más liviano el tiempo que ha transcurrido desde que empecé esta aventura, hace más de seis años.

A mi familia, por todo el apoyo y el cariño que he recibido, a quienes les debo todo lo que soy y todo lo que seré.

A Gema, mi aura y mi guía, mi fuerza y mi vida, has sufrido tanto como yo, pero al final lo hemos conseguido. Esta Tesis es parte de ti como lo es parte de mí.

Este proyecto de Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación recibida por parte del Ministerio de Educación y Ciencia a través de los proyectos CTM2006-04131/TECNO y CTM2007-60959, por parte de la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid y del Fondo Social Europeo a través del proyecto REMTAVARES (S2009/AMB-1588) y por parte del Programa INGENIO del Ministerio de Educación y Ciencia a través del proyecto Consolider-TRAGUA (CSD2006-0044).

NOMENCLATURA

^{14}C – Carbono 14
2345TeCP – 2,3,4,5-tetraclorofenol
2346TeCP – 2,3,4,6-tetraclorofenol
2356TeCP – 2,3,5,6-tetraclorofenol
235TCP – 2,3,5-triclorofenol
236TCP – 2,3,6-triclorofenol
23DCP – 2,3-diclorofenol
245T – Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético
245TCP – 2,4,5-triclorofenol
246TCP – 2,4,6-triclorofenol
246TCP_A – Concentración de 246TCP adsorbida en los gránulos
246TCP_E – Concentración de 246TCP en el medio en el equilibrio
24D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
24DCP – 2,4-diclorofenol
24DNT – 2,4,-dinitrotolueno
26DCP – 2,6-diclorofenol
2CP – 2-clorofenol
3' – Extremo 3' del ARNr
345TCP – 3,4,5-triclorofenol
34DCP – 3,4-triclorofenol
3C4HBc - Ácido 3-cloro-4-hidroxibenzoico
3C4HPA – Ácido 3-cloro-4-hidroxifenilacético
3CP – 3-clorofenol
4CP – 4-clorofenol
4HBc - Ácido 4-hidroxibenzoico
4HPA – Ácido 4-hidroxifenilacético
5' – Extremo 5' del ARNr
Ac - Acetato
AC – Alta carga
ADM1 – *Anaerobic Digestion Model n° 1* – Modelo de digestión anaerobia n° 1
AGV – Ácidos grasos volátiles
AMBR – *Anaerobic MBR* – Reactor MBR anaerobio
ARNr – Ácido ribonucleico ribosómico
ARNr 16S – Subunidad 16S del ARN ribosómico
ARNr 23S – Subunidad 23S del ARN ribosómico
ASBR – *Anaerobic SBR* – Reactor SBR anaerobio
ATP – Adenosín-trifosfato
BC – Baja carga
BOCM – Boletín Oficial de la Comunidad de Madrid
BOE – Boletín Oficial del Estado
BTEX – Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno
But - Butirato
c – Factor de inhibición de Levenspiel
C₁₈ – Grupo octadecil
CAH – Hidrocarburos clorados alifáticos

CaRD-FISH – *Catalized Reported Deposition FISH*
CDQO – Consumo de cosustrato
CDR – Clorofenol deshalogenasas reductivas
 C_e – Concentración en el equilibrio de adsorción
CEE – Comunidad Económica Europea
CERCLA - *Comprehensive Environmental Response Compensation and Liability Act* - Acta de respuesta medioambiental, compensación y responsabilidad.
Cit - Citocromo
CS – Consumo de clorofenol como sustrato
CSTR – *Continuous-Stirred Tank Reactor* – Reactor de mezcla completa continuo
Cy3 - Indocarbocianina
DAPI - 4',6'-diamin-2-fenilindol
DCB - Diclorobenceno
DCP - Diclorofenol
DQO – Demanda química de oxígeno
DR – Decloración reductiva
Dsf177 – Sonda específica para *Desulfitobacterium hafniense* PCP-1
Dsf326 – Sonda específica para *Desulfitobacterium*
Dsf576 – Sonda específica para *Desulfitobacterium hafniense*
DSMZ - *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* – Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares
E – Concentración de enzima
EBBR – *Expanded Bed Biofilm Reactor* – Reactor de lecho expandido con biopelículas
 EC_{50} – *Half Maximal Effective Concentration* - Mitad de la concentración efectiva máxima
EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético
EGSB – *Expanded Granular Sludge Bed* – Reactor de manto de lodo granular expandido
EL – Extracto de levadura
ES – Concentración del complejo enzima-sustrato
Et - Etanol
Eub388 – Sonda específica para *Bacteria*
FA - Formamida
FBBR – *Fluidized Bed Biofilm Reactor* – Reactor de lecho fluidizado con biopelículas
FFBR – *Fixed-Film Bioreactor* – Reactor biológico de lecho fijo
FISH – *Fluorescent in situ hybridization* – Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes
For - Formiato
 G_m – Producción máxima de metano para un tiempo de digestión infinito
HAc – Ácido acético
HAIB – *Horizontal-flow Anaerobic Immobilized Biomass* – Reactor de biomasa anaerobia inmovilizada de flujo horizontal
HPLC – *High-performance Liquid Chromatography* – Cromatografía líquida de alta eficacia
HR - Halorespiración
IC – *Internal Circulation* – Recirculación interna
 IC_{50} – Mitad de la concentración inhibitoria máxima
 I_M – Máxima concentración de inhibidor que permite actividad microbiana
IR – Índice de refracción
IWA – *International Water Association* – Asociación internacional del agua
 k – Constante de crecimiento de la biomasa de primer orden
 k_1 – Constante cinética de primer orden

k_2 – Constante cinética de segundo orden
 k_a – Constante de velocidad de adsorción
 k_{ap} – Constante de primer orden aparente
 K_f – Constante de Freundlich
 K_i – Constante de inhibición
 K_m – Constante de Michaelis-Menten
 k_M – Constante de primer orden de la metanogénesis
 K_s – Constante de saturación
 $K_{s,246TCP}$ – Constante de saturación para el 246TCP
 $K_{s,24DCP}$ – Constante de saturación para el 24DCP
 $K_{s,ap}$ – Constante de saturación aparente
Lac - Lactato
LAS – Sulfonato de alquilbenceno lineal
M – Cantidad de metano producida
m - meta
M - Metanogénesis
Mam - Metilamina
MBR – *Membrane bioreactor* – Reactor biológico de membranas
 M_c – Masa de carbón activo
MCM-41 – *Mobile Crystalline Material 41*- Material cristalino móvil 41
MCP - Monoclorofenol
Met - Metanol
MK - Menaquinona
 M_{max} – Cantidad de metano producida máxima
 n – Orden de inhibición
NE – No especificado
 n_f – Factor de Freundlich
 n_H – Número de Hill
NON338 – Sonda específica control negativo para *Bacteria*
NTA – Ácido nitrilotriacético
o - orto
OHPA – *Obligated Hydrogen Producers Acetogenic Bacteria* – Bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno.
P – Concentración de producto
p - para
PBS – Solución tampón de fosfatos
PCB – Bifenilo policlorado
PCE - Tetracloroetileno
PCP - pentaclorofenol
Ph - Fenol
Pr - Propionato
PRB – *Permeable Reactive Barriers* – Barreras reactivas permeables
 q – Cantidad de soluto adsorbida en el lecho de carbón activo
Q - Caudal
 q_e – Capacidad adsorptiva en el equilibrio
 q_t – Capacidad adsorptiva
 R^2 – Coeficiente de correlación
RBC – Reactor Biológico de Contacto

RD – Real Decreto
RMCD – Reactor de mezcla completa discontinuo
S – Concentración de sustrato
 $S_{1/2}$ – Constante de Hill
Sac - Sacarosa
 S_B – Concentración de sustrato biodegradable
SBR – *Sequencing Batch Reactor* – Reactor secuencial discontinuo
SDS – Dodecil sulfato sódico
SEM – *Scanning Electron Microscopy* – Microscopía electrónica de barrido
SMA – *Specific Methanogenic Activity* – Actividad metanogénica específica
 S_N – Concentración de sustrato no biodegradable
 S_o – Concentración inicial de sustrato
SST – Sólidos en suspensión totales
SSV – Sólidos en suspensión volátiles
TCE - Tricloroetileno
TCP - Triclorefenol
TeCP - Tetraclorofenol
 t_{HR} – Tiempo hidráulico de residencia
TNT - Trinitrotolueno
UASB – *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* – Reactor anaerobio de flujo ascendente con manto de lodos
US-EPA – *United States Environmental Protection Agency* – Agencia de protección medioambiental de Estados Unidos
UV - Ultravioleta
 v/v – volumen/volumen
 V_C – Volumen del lecho de carbón activo
VCO – Velocidad de carga orgánica
 V_{es} – Velocidad específica
 V_{esmax} – Velocidad específica máxima
VIS/UV – Visible/Ultravioleta
 V_m – Velocidad media
 V_{max} – Velocidad máxima
 $V_{max,246TCP}$ – Velocidad máxima de consumo de 246TCP
 $V_{max,24DCP}$ – Velocidad máxima de consumo de 24DCP
 V_o – Velocidad inicial
 V_s – Velocidad de consumo de sustrato
 V_T – Volumen total del reactor
 X – Concentración de la biomasa
 X_o – Concentración de biomasa inicial
 $Y_{X/S}$ – Factor de rendimiento de la biomasa
 μ_{max} – Velocidad máxima de crecimiento de la biomasa
 μ - Velocidad de crecimiento de la biomasa

ÍNDICE



Pico Almanzor. Ávila

*El lenguaje ha creado al hombre más que el hombre al
lenguaje.*

J. -L. Monod

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	
RESUMEN	11
OBJETIVOS Y ALCANCE DEL TRABAJO	27
CAPÍTULO 1: <i>Introducción</i>	33
CAPÍTULO 2: <i>Degradación anaerobia de 24DCP mediante reactores UASB y EGSB</i>	109
CAPÍTULO 3: <i>Biodegradación anaerobia de 24DCP en discontinuo</i>	129
CAPÍTULO 4: <i>Efecto de cosustratos en la degradación anaerobia de 246TCP</i>	157
CAPÍTULO 5: <i>Estudio de la inhibición de 246TCP sobre lodo granular anaerobio no adaptado</i>	175
CAPÍTULO 6: <i>Biodegradación de 246TCP con reactores anaerobios de alta eficiencia</i>	201
CAPÍTULO 7: <i>Aspectos microbiológicos de la biodegradación anaerobia de 246TCP en reactores de alta eficiencia</i>	241
CAPÍTULO 8: <i>Cinética de la biodegradación anaerobia de 246TCP</i>	267
CONCLUSIONES	295
BIBLIOGRAFÍA	299

ÍNDICE EXTENDIDO

ÍNDICE

RESUMEN	11
OBJETIVOS Y ALCANCE DEL TRABAJO	27
1. INTRODUCCIÓN	33
PREFACIO	35
1.1 Los compuestos clorofenólicos	36
<i>1.1.1 Usos y aplicaciones</i>	36
<i>1.1.2 Toxicidad</i>	37
<i>1.1.3 Caracterización del 2,4-diclorofenol</i>	38
<i>1.1.4 Caracterización de 2,4,6-triclorofenol</i>	39
1.2 Tratamiento de aguas residuales industriales y aplicación en la eliminación de clorofenoles	41
<i>1.2.1 Tecnologías no destructivas</i>	44
1.2.1.1 Descripción de las tecnologías no destructivas	44
1.2.1.2 Aplicación de tecnologías no destructivas en la eliminación de clorofenoles	45
<i>1.2.2 Tecnologías destructivas</i>	46
1.2.2.1 Métodos térmicos	46
1.2.2.2 Métodos químicos	46
1.2.2.3 Aplicación de tecnologías destructivas en la eliminación de clorofenoles	49
1.2.2.4 Métodos biológicos	51
1.2.2.5 Aplicación de métodos biológicos en la eliminación de clorofenoles	53
1.3 Tratamiento anaerobio de aguas residuales industriales y aplicación en la eliminación de clorofenoles	58
<i>1.3.1 Digestión anaerobia</i>	58
<i>1.3.2 La metanogénesis</i>	59
<i>1.3.3 Tecnologías anaerobias de alta eficiencia</i>	60
<i>1.3.4 La tecnología UASB</i>	64
1.3.4.1 Tratamiento de aguas residuales industriales heterogéneas	67
1.3.4.2 Tratamiento de compuestos inorgánicos	68
1.3.4.3 Tratamiento de compuestos orgánicos alifáticos	68
1.3.4.4 Tratamiento de compuestos orgánicos aromáticos	69

1.3.5 Biodegradación de clorofenoles en condiciones anaerobias	70
1.3.5.1 Conversiones abióticas. La habilidad de cloración de los cofactores	71
1.3.5.2 Clorofenoles como fuente de carbono y energía	71
1.3.5.3 Reducción reductiva	72
1.3.5.4 El género <i>Desulfotobacterium</i>	77
1.3.6 Tecnologías de alta eficiencia en la degradación anaerobia de clorofenoles	81
1.4 Modelización matemática de procesos biológicos	88
1.4.1 Biocinética	88
1.4.2 Modelización de consumo de sustratos	89
1.4.2.1 Modelo de Monod	90
1.4.2.2 Modelo de primer orden	90
1.4.2.3 Modelo de Hill	91
1.4.2.4 Modelo de segundo orden	91
1.4.2.5 Modelo de Haldane	92
1.4.3 Modelización de la metanogénesis	93
1.4.4 Modelización de procesos inhibitorios	94
1.4.4.1 Inhibición competitiva	95
1.4.4.2 Inhibición no competitiva	96
1.4.4.3 Inhibición acompetitiva	97
1.4.4.4 Modelo de Levenspiel	98
1.4.5 Modelización matemática en la biodegradación de clorofenoles	98
2. Degradación anaerobia de 24DCP mediante reactores UASB y EGSB	109
Resumen	111
2.1 Introducción	112
2.2 Materiales y métodos	115
2.2.1 Configuración de los reactores	115
2.2.2 Fuente de biomasa	115
2.2.3 Preparación del agua residual	115
2.2.4 Pruebas SMA y ensayos en discontinuo	116
2.2.5 Experimentos en continuo	117
2.2.6 Métodos analíticos	117
2.2.7 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	118
2.3 Resultados y discusión	119
2.3.1 Experimentos en discontinuo	119
2.3.2 Experimentos en continuo	120
2.3.2.1 Reactor UASB	120
2.3.2.2 Reactor EGSB	121
2.3.2.3 Formación de 4CP	121
2.3.2.4 Producción de metano	125
2.3.2.5 Estructura granular de los lodos UASB y EGSB	127

3. BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA DE 24DCP EN DISCONTINUO	129
Resumen	131
3.1 Introducción	132
3.2 Materiales y métodos	134
3.2.1 Fuente de biomasa	134
3.2.2 Preparación del agua residual sintética	134
3.2.3 Diseño experimental	134
3.2.4 Métodos experimentales y analíticos	135
3.3 Resultados y discusión	136
3.3.1 Degradación de glucosa y producción de metano	136
3.3.2 Ruta metabólica de los procesos fermentativos de la glucosa	140
3.3.3 Biodegradación de 24DCP	142
3.3.4 Cálculo de los parámetros cinéticos	145
3.3.5 Modelado cinético de los procesos inhibitorios	149
4. EFECTO DE COSUSTRATOS EN LA DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE 246TCP	157
Resumen	159
4.1 Introducción	160
4.2 Materiales y métodos	162
4.2.1 Fuente de biomasa	162
4.2.2 Ensayos de adsorción/desorción	162
4.2.3 Ensayos de biodegradabilidad en ausencia de cosustrato	162
4.2.4 Ensayos de inhibición	163
4.2.5 Experimentos con diferentes cosustratos	163
4.2.6 Métodos analíticos	164
4.3 Resultados y discusión	165
4.3.1 Ensayos de adsorción/desorción	165
4.3.2 Ensayos de biodegradabilidad	165
4.3.3 Ensayos de inhibición	165
4.3.4 Experimentos con diferentes cosustratos	167
4.3.4.1 Etanol	167
4.3.4.2 Extracto de levadura	167
4.3.4.3 AGV	168
4.3.4.4 Metilamina	168
4.3.4.5 Sacarosa	169

4.3.4.6 Metanol	169
4.3.4.7 Lactato	172
4.3.4.8 Formiato	173
4.3.5 Ruta degradativa anaerobia	173
5. INHIBICIÓN DE LODO GRANULAR ANAEROBIO NO ADAPTADO POR 246TCP	175
Resumen	177
5.1 Introducción	178
5.2 Materiales y métodos	180
5.2.1 Fuente de biomasa	180
5.2.2 Ensayos de inhibición	180
5.2.3 Métodos analíticos	180
5.3 Resultados y discusión	181
5.3.1 Producción de metano y consumo de DQO	181
5.3.2 Aproximación cinética de la metanogénesis y del consumo de DQO	186
5.3.2.1 Cálculo de los parámetros cinéticos	186
5.3.2.2 Modelización cinética de los procesos inhibitorios	188
5.3.3 Biodegradación de 246TCP	193
5.3.4 Cinética de biodegradación de 246TCP	196
6. BIODEGRADACIÓN DE 246TCP CON REACTORES ANAEROBIOS DE ALTA EFICIENCIA	201
Resumen	203
6.1 Introducción	204
6.2 Materiales y métodos	206
6.2.1 Configuración de los reactores	206
6.2.2 Fuente de biomasa	206
6.2.3 Bioaumentación	207
6.2.4 Preparación del agua residual sintética	208
6.2.5 Experimentos en continuo	209
6.2.6 Estudios de adsorción de 246TCP sobre carbón activo	210
6.2.7 Estudios de toxicidad extrema	211
6.2.8 Métodos analíticos	211
6.3 Resultados y discusión	212
6.3.1 Aclimatación y bioaumentación	213
6.3.2 Operación de los reactores en continuo	213

6.3.2.1 Reactor EGSB-C	213
6.3.2.2 Reactor EGSB-Bio	218
6.3.2.3 Reactor FBBR	223
6.3.2.4 Estudio de la adsorción de 246TCP sobre carbón activo	227
6.3.2.5 Comparación del comportamiento de los reactores	232
6.3.3 <i>Estudio del comportamiento de los reactores anaerobios bajo régimen no estacionario</i>	234
6.3.3.1 Estudio del comportamiento de los reactores anaerobios para una velocidad de carga de 246TCP de 1000 mg L ⁻¹ d ⁻¹	234
6.3.3.2 Estudio del comportamiento de los reactores anaerobios sometidos a un pulso de 246TCP de 1000 mg L ⁻¹	237
6.3.3.3 Implicaciones de los resultados obtenidos con los estudios en régimen no estacionario	238
7. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS EN LA DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE 246TCP CON REACTORES ANAEROBIOS DE ALTA EFICIENCIA	241
Resumen	243
7.1 Introducción	244
7.2 Materiales y métodos	248
7.2.1 <i>Fuente de biomasa y métodos analíticos</i>	248
7.2.2 <i>Hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH)</i>	248
7.2.2.1 Fijación	248
7.2.2.2 Hibridación	248
7.2.2.3 Análisis y cuantificación de células por microscopía y edición de imágenes	249
7.2.2.2 <i>Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)</i>	251
7.3 Resultados y discusión	252
7.3.1 <i>Evolución del contenido en SSV en los gránulos anaerobios y el carbón activo</i>	252
7.3.2 <i>Evolución de la estructura de los gránulos y del carbón activo. Colonización del carbón activo</i>	253
7.3.3 <i>Análisis por FISH</i>	258
7.3.3.1 Optimización y puesta a punto de las sondas	258
7.3.3.2 Cuantificación de microorganismos	259
7.3.3.3 Relevancia de la especie <i>D. chlororespirans</i> en el cómputo global del proceso	265
8. CINÉTICA DE LA BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA DE 246TCP	267
Resumen	269
8.1 Introducción	270

8.2 Materiales y métodos	272
8.2.1 Reactores	272
8.2.2 Fuente de biomasa	273
8.2.3 Preparación del agua sintética	273
8.2.4 Diseño del experimento	273
8.2.5 Métodos analíticos	274
8.3 Resultados y discusión	275
8.3.1 Influencia del 246TCP sobre los procesos fermentativos	275
8.3.2 Cinética de la inhibición de la metanogénesis	282
8.3.3 Biodegradación y dechloración de 246TCP	287
8.3.4 Modelo cinético de la dechloración anaerobia de 246TCP	289
BIBLIOGRAFÍA	299

RESUMEN



Ruta del Cares. Picos de Europa. Asturias.

*En dos palabras puedo resumir cuanto he aprendido acerca
de la vida: sigue adelante.*

R. L. Frost

La contaminación del agua es uno de los principales problemas ambientales a los que debe enfrentarse el ser humano. Los compuestos clorofenólicos son un tipo de contaminantes que pueden estar presentes tanto en aguas residuales como en cauces naturales y en acuíferos, debido a su uso extendido agroindustrial en la fabricación de antisépticos, pinturas, fungicidas, insecticidas, preservantes de la madera o como subproducto residual en procesos industriales tales como el blanqueo de la pulpa de papel. Los clorofenoles son compuestos químicos extremadamente tóxicos con propiedades carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas. La toxicidad de estos compuestos está relacionada con su alto grado de hidrofobicidad, lo que facilita su adhesión en las membranas celulares, interfiriendo así en el metabolismo de los seres vivos. Como consecuencia de la toxicidad de estos compuestos, se ha desarrollado legislación, a nivel nacional e internacional, cada vez más restrictiva, lo que ha generado una creciente preocupación por la búsqueda de sistemas eficaces de eliminación de estos compuestos de las aguas residuales.

Los compuestos clorofenólicos han sido tratados mediante un amplio abanico de tecnologías. Así, entre las tecnologías no destructivas más empleadas se encuentran la adsorción, la extracción líquido-líquido y la separación por membranas. Dentro de las tecnologías destructivas, los procesos de oxidación húmeda, incluida su versión catalítica, aunque ofrecen buenos resultados y elevadas eficiencias de degradación, son cada vez menos utilizados debido a la posible generación de compuestos altamente tóxicos, como las dibenzo-*p*-dioxinas policloradas y los furanos, y al elevado gasto energético necesario para el proceso. Los procesos de oxidación avanzada, en cambio, pueden afrontar el problema de manera más eficiente y menos contaminante, aunque, debido al coste de estos procesos, su utilización está restringida a caudales relativamente bajos ($< 5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$). Otros tratamientos aplicables a la eliminación de clorofenoles son los procesos de reducción, como la hidrogenación catalítica, aunque en este caso son necesarios tratamientos de depuración posteriores para la eliminación de materia orgánica. Respecto a los sistemas de oxidación biológica por vía aerobia, se han estudiado estrategias que emplean desde plantas (fitorremediación), hasta hongos y bacterias. Estas últimas han sido, con mucho, las más empleadas. Las tecnologías aerobias más utilizadas para la oxidación de clorofenoles han sido los reactores secuenciales discontinuos (SBR), reactores de lecho fluidizado, *air-lift* y reactores de membrana (MBR). El principal problema de estas tecnologías es que, si el proceso de oxidación no es completo, pueden generar compuestos con elevada toxicidad, como los clorocatecoles y las clorohidroquinonas.

La digestión anaerobia es un proceso complejo que está constituido por una sucesión de etapas, en la que la metanogénesis es la etapa clave del mismo debido a su sensibilidad y a las condiciones de funcionamiento. El metano se puede generar mediante tres vías metanogénicas principales: hidrogenotrófica, acetoclástica y metilotrófica, siendo la degradación de acetato la principal fuente de producción de metano en un reactor anaerobio (65-70%). Los reactores anaerobios más utilizados para la descontaminación de aguas de origen industrial son los reactores secuenciales discontinuos anaerobios (ASBR), los reactores de membrana anaerobios (AMBR), los reactores de lecho fijo, expandido y fluidizado y los reactores de manto de lodos y flujo ascendente (UASB), así como variaciones de éstos, como los reactores de lecho granular expandido (EGSB) y los reactores con recirculación interna (IC). Éstos últimos constituyen actualmente el 70-80% de los reactores industriales instalados a nivel mundial. Son reactores de flujo ascendente cuyo funcionamiento radica en la formación de biogránulos, compuestos por agregaciones de microorganismos densas y compactas. Los reactores tipo UASB se han empleado extensamente tanto para el tratamiento de aguas residuales industriales heterogéneas como para la eliminación de numerosos compuestos tóxicos de distinta procedencia, lo que da idea de su gran versatilidad.

Los clorofenoles son degradados por vía anaerobia actuando como aceptores de electrones mediante un proceso termodinámicamente favorable denominado decloración reductiva, en el cual los átomos de cloro del anillo fenólico son sustituidos por átomos de hidrógeno. Este proceso puede suceder espontáneamente en un sistema anaerobio mediante conversiones abióticas o procesos cometabólicos, o bien mediante la acción activa de algunos microorganismos para la obtención de energía y poder reductor, lo que se conoce como halorespiración. Existen varios táxones capaces de realizar halorespiración, la mayoría relacionadas con las bacterias sulfatorreductoras del phylum *Firmicutes*. El proceso de halorespiración está mediado por un grupo de enzimas llamados deshalogenasas reductivas, y hasta ahora solo se han identificado enzimas para la *orto*- y *meta*-decloración, siendo la posición *para* la más difícil de declorar. Entre las bacterias halorespirativas, el género *Desulfitobacterium* es el más importante, dado que se han aislado 9 especies diferentes, siendo el único hasta el momento con capacidad para declorar en las tres posiciones del anillo fenólico.

El tratamiento de clorofenoles mediante reactores anaerobios de alta eficiencia ha sido analizado principalmente mediante el empleo de reactores tipo UASB y reactores de lecho fluidizado con biopelículas (FBBR). Los clorofenoles estudiados mediante este tipo de tecnologías han sido el pentaclorofenol (PCP), el 2,4,6-triclorofenol (246TCP), el 2,4-diclorofenol (24DCP), el 4-clorofenol (4CP) y el 2-clorofenol (2CP). Las eficiencias de biodegradación de estos compuestos han sido elevadas, aunque resulta necesario profundizar en el estudio de las condiciones de operación, tipos de donantes de electrones, cinética del proceso y estudios inhibitorios, de cara a la aplicación de estas tecnologías a nivel de planta piloto o escala industrial.

La modelización matemática de los procesos biológicos es indispensable para el correcto diseño de plantas de tratamiento a nivel industrial. Los modelos de Monod, Hill y Haldane, así como modelos potenciales, han sido los más empleados para evaluar la cinética de consumo de sustratos. La metanogénesis habitualmente se explica mediante el modelo de Monod, aunque en muchas ocasiones se ha simplificado a un pseudo-primer orden cuando la concentración de sustrato no es limitante. El estudio cinético de los procesos inhibitorios suele hacer uso de estos modelos, modificados mediante factores de inhibición. En función del parámetro al que afecten estos factores, existen modelos de inhibición competitivos, si la inhibición afecta a la constante de saturación; no competitivos, si la inhibición afecta a la velocidad máxima de crecimiento celular; o acompetitivos, si la inhibición afecta a ambos parámetros. También se han desarrollado modelos empíricos para predecir efectos inhibitorios, como el modelo de Levenspiel. En condiciones anaerobias, es destacable la ausencia de trabajos sobre cinética de degradación de clorofenoles y estudios cinéticos que expliquen el grado de inhibición que estos compuestos ejercen sobre la biomasa.

En la presente memoria se estudia la biodegradación anaerobia de dos compuestos clorofenólicos representativos, 24DCP (Capítulos 2 y 3) y 246TCP (Capítulos 4-8). La memoria está estructurada de forma modular, y cada capítulo constituye una entidad independiente.

La biodegradación anaerobia de 24DCP se ha estudiado en régimen continuo (**Capítulo 2**) y discontinuo (**Capítulo 3**). En los ensayos en continuo se utilizaron dos reactores UASB y EGSB inoculados con lodo granular anaerobio de dos procedencias: un reactor UASB a escala laboratorio que trataba aguas residuales de una industria cosmética y

un reactor UASB industrial que trataba aguas residuales de una industria de reciclado de papel. Mediante la realización de ensayos en discontinuo se comprobó que el consumo de glucosa favorecía la biodegradación de 24DCP. Así, se empleó este sustrato como fuente de carbono principal en un medio metanogénico tamponado estándar. Las variables empleadas para la comparación de ambos reactores fueron la eficiencia de consumo de DQO y de producción de metano, la degradación de 24DCP y la generación de 4CP. Los reactores se operaron en continuo durante 180 d, en 140 de los cuales la velocidad de carga de 24DCP se fue incrementando desde 5 hasta 105 mg 24DCP L⁻¹ d⁻¹, mientras que se utilizó una velocidad de carga orgánica (VCO) inicialmente de 4 g DQO L⁻¹ d⁻¹ que se disminuyó durante el transcurso de la operación a 2 g DQO L⁻¹ d⁻¹ para mejorar la eficiencia de decloración.

En ambos reactores se obtuvieron eficiencias de consumo de DQO y de degradación de 24DCP superiores al 80% y 90%, respectivamente, con velocidades de carga de 24DCP de hasta 60 mg 24DCP L⁻¹ d⁻¹, siendo el rendimiento metanogénico muy superior en el reactor EGSB. Al aumentar la velocidad de carga de 24DCP hasta 105 mg L⁻¹ d⁻¹, en el reactor UASB disminuyeron paulatinamente las eficiencias de consumo de DQO y degradación de 24DCP hasta valores en torno al 60 y 20%, respectivamente, mientras que el reactor EGSB logró mantener ambas eficiencias en valores en torno al 80%. La actividad metanogénica del reactor UASB resultó insignificante, mientras que en el reactor EGSB se obtuvieron valores medios de 0,1 g CH₄-DQO g⁻¹ DQO consumida.

En los 40 últimos días se disminuyó la velocidad de carga de 24DCP paulatinamente hasta 25 mg 24DCP L⁻¹ d⁻¹ y se aumentó la VCO hasta 6 g DQO L⁻¹ d⁻¹ con el objetivo de recuperar el rendimiento de ambos reactores y principalmente la actividad metanogénica. Así, la actividad metanogénica de los reactores UASB y EGSB se incrementó hasta valores en torno a 0,1 y 0,2 g CH₄-DQO g⁻¹ DQO, respectivamente, pero la eficiencia de degradación de DQO sólo pudo recuperarse en el reactor EGSB, lo que sugiere la aparición de una inhibición irreversible en alguna etapa del catabolismo de la glucosa en el reactor UASB, provocada por la carga aplicada de 24DCP. Esta inhibición no debió afectar a las bacterias decloradoras, ya que la eficiencia de degradación de 24DCP si fue recuperada en ambos reactores hasta valores en torno al 80%. Finalmente, mediante estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM) se comprobó que la morfología granular de ambos reactores no se vio afectada por el 24DCP, aunque se encontraron mayores concentraciones de sólidos volátiles en el lodo del reactor

EGSB al final del experimento, lo que permite parcialmente explicar las diferencias encontradas entre ambos reactores.

En el **Capítulo 3**, con el objetivo de profundizar en el estudio del proceso de biodegradación de 24DCP, se realizaron ensayos en discontinuo utilizando lodo granular anaerobio procedente del reactor EGSB empleado en el Capítulo 2. Los ensayos se realizaron sin agitación a 30 ± 1 °C utilizando el mismo medio de reacción que en el Capítulo 2, al que se añadió $\text{Na}_2\text{S} \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ y se intercambió el espacio de cabeza por $\text{N}_2:\text{CO}_2$ 80:20 para asegurar condiciones anaerobias. Se ensayaron concentraciones de 24DCP entre 10 y 250 mg L^{-1} , empleando concentraciones de glucosa de 4 g L^{-1} (identificada como baja carga) y 35 g L^{-1} (identificada como alta carga). Los resultados se discutieron mediante el análisis de la evolución de 24DCP, DQO, CH_4 producido, glucosa e intermedios de reacción (ácidos grasos volátiles, ácido láctico y etanol).

Los microorganismos implicados en la degradación de la glucosa emplearon rutas metabólicas diferentes según la concentración de glucosa ensayada. Así, en los ensayos a alta carga la glucosa fue fermentada mediante la ruta heteroláctica (vía fosfocetolasa), generando de esta forma etanol y ácido láctico, mientras que en los ensayos a baja carga la ruta principal fue la ácido-mixta (vía glucólisis), generando etanol y los ácidos láctico, acético y fórmico. En ambos casos tuvo lugar también la fermentación propiónica, la oxidación anaerobia de ácido propiónico a etanol y ácido acético, la oxidación anaerobia de ácido láctico y la oxidación anaerobia de etanol (por acción de las sintrofobacterias), aunque esta reacción estuvo parcialmente inhibida en todos los ensayos, por lo que la acumulación de etanol no debe atribuirse a la presencia del 24DCP. La acumulación de acetato en el medio indica que la vía principal de la metanogénesis fue la hidrogenotrófica. Observando la evolución de los intermedios de degradación de la glucosa al variar la concentración de 24DCP, se pudo establecer que este compuesto inhibió tanto la ruta heteroláctica (alta carga) como la ruta ácido-mixta (baja carga) de la fermentación de la glucosa, la acetogénesis del ácido láctico y la metanogénesis hidrogenotrófica. En ambos ensayos la degradación de 24DCP se produjo principalmente durante las primeras horas del proceso, gracias a la generación de hidrógeno debido a las diferentes etapas fermentativas.

Se realizó el análisis cinético de los procesos de degradación de 24DCP, glucosa y metanogénesis hidrogenotrófica. Para ambas cargas de glucosa se observó que la degradación

de 24DCP no estuvo inhibida, y que el perfil de velocidades iniciales pudo ajustarse a la ecuación de Hill. Los valores de los parámetros V_{max} y $S_{1/2}$ fueron similares para ambas cargas de glucosa. En cambio, el valor de la constante de Hill fue diferente, lo que indica que a bajas cargas de glucosa la decoloración de 24DCP sucede mediante cooperatividad alostérica positiva, mientras que a concentraciones altas no existe cooperatividad entre el sustrato (24DCP) y los enzimas involucrados en la decoloración reductiva. Respecto al efecto del 24DCP sobre la cinética de degradación de la glucosa y la metanogénesis hidrogenotrófica, se encontró que las velocidades iniciales de ambos procesos disminuyen de forma potencial con respecto a la concentración de 24DCP aplicada. Estudiando los perfiles de velocidad instantánea de ambos procesos, se encontró que el área integral se desplazó tanto en el eje temporal como en el eje de velocidad, disminuyendo tanto la velocidad máxima como la afinidad de los microorganismos por el sustrato, lo cual indica un tipo de inhibición acompetitiva. Por ello, la inhibición de ambos procesos se ajustó a modelos cinéticos de inhibición acompetitiva de orden n . El orden de inhibición fue ligeramente similar para las cinéticas de inhibición del consumo de glucosa y metanogénesis hidrogenotrófica, por lo que el 24DCP ejerció un efecto inhibitorio no selectivo, mientras que la constante de inhibición fue superior en el caso del consumo de sustrato, lo cual indica que el 24DCP afecta de forma más acusada a la metanogénesis hidrogenotrófica que a los procesos de fermentación de la glucosa.

El estudio de la biodegradación anaerobia de 246TCP se aborda de forma deductiva, utilizando las conclusiones de ensayos previos como base de partida para los ensayos posteriores. Así, se realizó un ensayo inicial enfocado a la búsqueda de los cosustratos más adecuados para la biodegradación de 246TCP (**Capítulo 4**). Utilizando la mejor combinación de cosustratos, se realizó un estudio en discontinuo con lodo anaerobio no adaptado, en el que se analizó el efecto de 246TCP sobre la metanogénesis, la degradación de la DQO y la decoloración reductiva (**Capítulo 5**). Posteriormente, con objeto de mejorar la biodegradación del 246TCP, se realizó un ensayo en continuo utilizando reactores EGSB y FBBR bioaumentados con cepas *Desulfitobacterium* (**Capítulos 6 y 7**). Finalmente, se analizó la ruta metabólica de degradación de los cosustratos y la cinética de degradación de 246TCP mediante ensayos en discontinuo utilizando lodo extraído de los reactores EGSB (**Capítulo 8**).

En el **Capítulo 4** se estudió la biodegradación del 246TCP empleando varios cosustratos carbonosos: lactato, sacarosa, ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico en proporción másica 1:1:1), etanol, metanol, extracto de levadura, formiato y metilamina, con la finalidad de determinar la mezcla de cosustratos óptima con vistas a su utilización en la alimentación de reactores anaerobios de alta eficiencia. El lodo utilizado se obtuvo del reactor EGSB utilizado para tratar 24DCP (Capítulo 2). Se comprobó que la adsorción de 246TCP sobre lodo autoclavado en un medio tamponado sin fuente de carbono resultó poco significativa. Se realizó un ensayo de inhibición en el que se empleó acetato en un medio metanogénico, con el fin de obtener la EC_{50} de la metanogénesis acetotrófica, que resultó ser de 110-115 mg 246TCP L^{-1} . Los ensayos con los cosustratos se realizaron mediante 3 alimentaciones, en las que se adicionó una fuente de carbono y nutrientes, añadiendo el 246TCP en la segunda alimentación. Las concentraciones ensayadas de 246TCP fueron 80 y 113 mg L^{-1} (EC_{50}), mientras que se emplearon concentraciones de cosustratos de 4 g DQO L^{-1} , salvo en el caso del formiato y la metilamina, que fueron de 2 g DQO L^{-1} por motivos de toxicidad. Para evaluar la eficacia de los cosustratos se analizó la evolución del 246TCP y de sus intermedios de reacción (24DCP, 26DCP, 4CP y 2CP), así como la producción de CH_4 .

En ninguno de los casos se alcanzó la completa decloración de 246TCP, ya que se acumularon intermedios de degradación propios de la *orto*-decloración (4CP con metanol, etanol y ácidos grasos volátiles y 24DCP con lactato) o de la *para*-decloración (en los casos del extracto de levadura y de la sacarosa). Utilizando metilamina y formiato la degradación de 246TCP fue sólo parcial, acumulándose una cantidad significativa al final del experimento. El 4CP resultó el producto más refractario de la degradación anaerobia, ya que solo pudo ser eliminado de forma significativa empleando extracto de levadura, metanol y metilamina como donantes de electrones. En la mayoría de los casos la eficiencia de decloración resultó superior después de la tercera alimentación, excepto para la metilamina y el formiato, los cuales son sustratos directos de la metanogénesis. De esta forma, se comprobó que el consorcio declorador puede ser convenientemente activado si se utiliza un donante de electrones adecuado.

La inhibición de la metanogénesis causada por 246TCP resultó especialmente significativa utilizando metilamina, formiato y ácidos grasos volátiles como cosustratos,

mientras que fue muy inferior con el empleo de etanol. Mediante el empleo de metanol y etanol se alcanzaron las mayores velocidades de dechloración, por lo que se pueden considerar como los cosustratos más adecuados para el tratamiento de aguas residuales que contengan 246TCP. La adición de sacarosa y de extracto de levadura permite activar la *para*-dechloración, logrando así la dechloración completa de 246TCP. Los resultados obtenidos en este estudio se utilizaron para establecer la composición de las aguas residuales sintéticas utilizadas en los ensayos posteriores, de tal manera que se eligió una mezcla de cosustratos constituida por sacarosa, etanol y extracto de levadura en relación de DQO 3:2:0,1 con el objetivo de disponer de fuente de hidrógeno derivada de la fermentación de la sacarosa, optimizar la dechloración del 246TCP al utilizar etanol y permitir la activación de la ruta de *para*-dechloración al contener el medio tanto sacarosa como extracto de levadura.

En el **Capítulo 5** se estudió la degradación de 246TCP en discontinuo empleando el mismo lodo y la misma metodología de trabajo descrita en el Capítulo 4. Se ensayaron concentraciones de 246TCP entre 3,3 y 200 mg L⁻¹, mientras que la concentración de la fuente de carbono se fijó en 4 g DQO L⁻¹ en un medio metanogénico estándar. Se observó una fuerte inhibición de la metanogénesis provocada por el 246TCP, llegando a reducir la actividad metanogénica específica (SMA) en un 83% para una concentración de 246TCP de 200 mg L⁻¹ en la tercera alimentación. La producción de metano tuvo lugar por vía hidrogenotrófica y acetoclástica, sucediendo la primera durante la etapa inicial de acidogénesis de los cosustratos orgánicos. La presencia de 246TCP afectó principalmente a la metanogénesis acetoclástica. Para evaluar la inhibición de la metanogénesis se calcularon las velocidades iniciales de producción de metano a partir de los datos de la metanogénesis acetoclástica en la segunda y tercera alimentación. Estos datos se ajustaron a un modelo de pseudo-primer orden con un término de inhibición, encontrándose que el efecto inhibitorio de 246TCP resultó diferente en ambas alimentaciones, lo cual implica que los metanógenos acetoclásticos se adaptaron al 246TCP hasta una concentración de 25 mg 246TCP L⁻¹.

De igual forma, el 246TCP ejerció un efecto inhibitorio sobre la degradación de la DQO, viéndose reducida tanto su velocidad inicial como su velocidad media de degradación. Para concentraciones de 246TCP superiores a 50 mg L⁻¹, la reducción de la DQO fue comparativamente inferior que la producción de metano en la segunda alimentación, lo cual refuerza la hipótesis de que la metanogénesis hidrogenotrófica tuvo lugar durante las primeras

etapas del proceso, dado que este tipo de metanogénesis no causa una reducción significativa en la DQO. Por otra parte, se encontró una relación lineal entre las velocidades medias de degradación de DQO y producción de metano, lo cual implica que la inhibición de ambos procesos fue proporcional. Los valores calculados de las velocidades iniciales se ajustaron a un modelo de Monod con un término de inhibición acompetitiva. Los parámetros del modelo de Monod modificado se calcularon previamente utilizando los datos de la evolución de la DQO en el ensayo blanco. Estos valores se fijaron en el posterior ajuste de las velocidades iniciales teniendo en cuenta el efecto inhibitorio del 246TCP. Comparando los parámetros obtenidos en los procesos de metanogénesis acetoclástica y degradación de DQO, se puede afirmar que los organismos metanógenos acetoclásticos resistieron concentraciones de 246TCP más elevadas que los acidógenos pero, bajo concentraciones inhibitorias, su actividad se vio seriamente dañada.

En el proceso de degradación de 246TCP se observó un periodo de latencia que dependió de la concentración inicial de este compuesto, alcanzando las 300 h en el caso de concentraciones de 200 mg L^{-1} . La ruta de degradación de 246TCP transcurrió principalmente mediante *orto*-decloración, generando en todos los casos una elevada cantidad de 4CP, aunque la aparición de pequeñas concentraciones de 26DCP y 2CP indican que la ruta *para* también tuvo lugar. La concentración acumulada de 4CP no fue proporcional a la concentración inicial de 246TCP, lo cual confirma la hipótesis de que el proceso de biodegradación del 246TCP estuvo inhibido. Tanto las velocidades iniciales (calculadas a partir del periodo de latencia) como la evolución de la concentración de 246TCP se ajustaron así al modelo de Haldane. Dicho modelo permitió describir adecuadamente los resultados experimentales obtenidos para todas las concentraciones de 246TCP ensayadas.

En el **Capítulo 6** se estudió la biodegradación de 246TCP empleando reactores EGSB y FBBR inoculados con cepas del género *Desulfitobacterium*, mientras que los aspectos microbiológicos de los reactores se abordan en el **Capítulo 7**. El estudio se llevó a cabo en tres reactores idénticos a los utilizados en la biodegradación de 24DCP en continuo (Capítulo 2). Dos de ellos se operaron como reactores EGSB y se inocularon con una mezcla de lodos granulares anaerobios procedentes del reactor EGSB empleado para tratar 24DCP (Capítulo 2) y de un reactor UASB industrial situado en una planta de reciclado de papel. El tercero se operó como reactor FBBR, utilizando como soporte carbón activo granular. La

biomasa se activó en los reactores EGSB hasta alcanzar condiciones estacionarias. Posteriormente, uno de los dos reactores EGSB (EGSB-Bio) y el reactor FBBR fueron bioaumentados con una mezcla equimásica de *D. hafniense* PCP-1, *D. hafniense* TCP-A y *D. chlororespirans*. El otro reactor EGSB se utilizó como control (EGSB-C). Durante el periodo de bioaumentación se trabajó en régimen discontinuo con adiciones sucesivas de fuente de carbono y $10 \text{ mg } 246\text{TCP L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, por lo que este periodo sirvió además de aclimatación de la biomasa a 246TCP. Tras el periodo de bioaumentación, los reactores se operaron en continuo empleando un tiempo de retención hidráulico de 24 h durante 248 d, en los cuales se aumentó progresivamente la velocidad de carga de 246TCP desde 10 hasta $250 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Inicialmente se empleó una VCO de $8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para promover el crecimiento de biomasa en el reactor FBBR, disminuyéndose a lo largo del experimento a $4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Diariamente se determinaron las eficiencias de degradación de DQO, de 246TCP y de decloración, así como la actividad metanogénica. Además, periódicamente se extrajeron muestras de lodo y carbón activo de los reactores y se fijaron para su posterior análisis morfológico mediante SEM y microbiológico mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH), así como para estudiar la composición en SSV y SST.

En los tres reactores se observó que la vía preferencial de decloración sucedió en posición *orto*, generando principalmente 4CP. En el reactor EGSB-C se detectó además una elevada concentración de 24DCP en los efluentes para velocidades de carga de 246TCP superiores a $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, lo cual implica la aparición de fenómenos de inhibición competitiva. También se detectaron en los efluentes de sendos reactores concentraciones de intermedios propios de *para*-decloración (26DCP y 2CP), durante los primeros días de operación. En los reactores EGSB la eficiencia de decloración comenzó a aumentar a partir del día 150, alcanzándose valores máximos de decloración en los últimos días de estudio en torno al 40% en el reactor EGSB-Bio, respecto al 20% en el reactor EGSB-C. En el reactor FBBR, la eficiencia de decloración se estabilizó en valores en torno al 50% en los últimos días de operación. La presencia de 246TCP afectó de manera diferente en cada reactor a la eficiencia de degradación de DQO y a la actividad metanogénica, resultando siempre inferior en el reactor EGSB-C.

Los estudios morfológicos mediante SEM mostraron que el interior de los gránulos pertenecientes a los reactores EGSB permaneció bastante homogéneo. Mediante estudios

FISH se puso de manifiesto que el lodo de partida contenía aproximadamente un 34% de microorganismos pertenecientes al género *Desulfitobacterium*, que mediante hibridación con sondas específicas resultaron pertenecer a la especie *D. hafniense*, mientras que no se detectaron bacterias pertenecientes a la especie *D. chlororespirans*. La única diferencia microbiológica relevante entre el reactor EGSB-C y los reactores EGSB-Bio y FBBR fue la presencia de esta última especie. Además, se observó que dicha especie se asentó en los dos reactores bioaumentados. Por otra parte, no se detectaron cambios significativos en la proporción de organismos del dominio *Archaea* (representado principalmente en los reactores anaerobios por metanógenos) en los reactores EGSB, lo cual justifica la estabilidad mostrada en la actividad metanogénica en los reactores. En el reactor FBBR, por el contrario, la comunidad metanogénica se desarrolló a lo largo de todo el periodo de estudio, llegando a suponer el 35% de los microorganismos adheridos al carbón activo.

Al finalizar el periodo de estudio en continuo, se llevaron a cabo dos experimentos en estado no estacionario. En el primero se aumentó la velocidad de carga de 246TCP desde 250 hasta 1000 mg L⁻¹ d⁻¹ durante 22 horas, para volver después a la velocidad de carga inicial. En el segundo, se añadió un pulso de carga puntual de 246TCP para elevar la concentración en el interior de los reactores hasta 1000 mg L⁻¹, trabajando con una velocidad de carga de 250 mg L⁻¹ d⁻¹. En ambos estudios el reactor EGSB-Bio demostró ser más estable que el reactor EGSB-C, mostrando periodos de inhibición por el aumento de carga de 246TCP más cortos y menos intensos. Por otra parte, el reactor FBBR presentó una elevada estabilidad, ya que apenas disminuyó su rendimiento por los cambios de velocidad de carga aplicados. La bioaumentación, por tanto, no mejoró la eficiencia general del sistema, pero sí incrementó la resistencia del mismo a condiciones inhibitorias extremas durante periodos relativamente cortos, mejorando la estabilidad de los reactores a largo plazo. Los estudios FISH muestran que la especie *D. chlororespirans* tuvo un papel relevante en la mejora de la estabilidad del sistema.

Finalmente, en el **Capítulo 8** se estudió la biodegradación anaerobia de 246TCP en digestores discontinuos inoculados con lodo anaerobio extraído de los reactores EGSB empleados en el Capítulo 6. Los ensayos se realizaron con concentraciones de biomasa en torno a 10 g SSV L⁻¹, intentando así simular las condiciones empleadas en los reactores EGSB. Se realizaron cuatro ensayos en serie empleando el mismo agua residual sintética que

en los ensayos en continuo, y concentraciones de 246TCP entre 75 y 150 mg L⁻¹. Entre cada ensayo, el lodo se lavó con solución salina (PBS) y se reactivó durante 3-4 d con agua sintética pero sin 246TCP para eliminar los restos de clorofenoles del ensayo anterior y trabajar así en las mismas condiciones de operación.

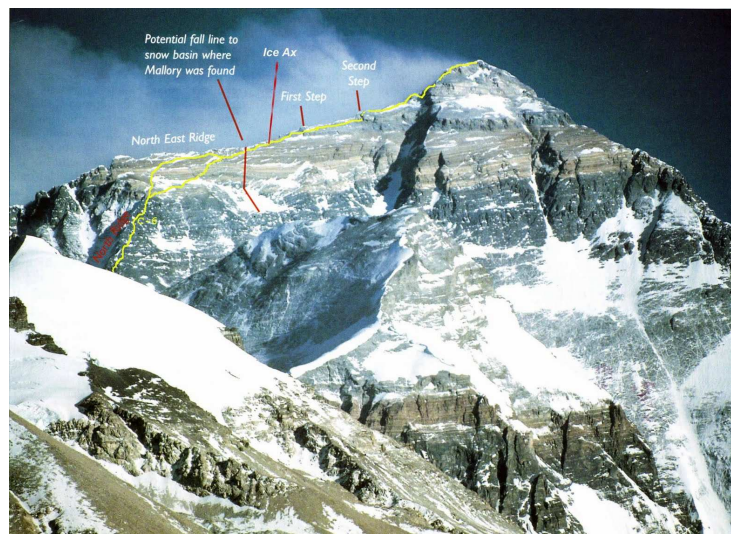
Tanto la degradación de la DQO como la metanogénesis se vio afectada de forma similar en ambos reactores por la presencia de 246TCP, observándose una progresiva inhibición del consumo de DQO y producción de metano para concentraciones de 246TCP superiores a 50 mg L⁻¹. Ambos procesos inhibitorios sucedieron tras un periodo de latencia, de en torno a 10 h, relacionado con el tiempo necesario para que el tóxico difunda a través de los gránulos y entre en contacto con los microorganismos. La degradación de los cosustratos sucedió principalmente mediante fermentación ácido-mixta, fermentación propiónica y oxidación anaerobia de etanol. Los procesos más afectados por la presencia de 246TCP fueron la metanogénesis acetoclástica y la oxidación anaerobia de propionato, ya que para concentraciones de 246TCP superiores a 50 mg L⁻¹ se acumularon en el medio acetato y propionato. También se vieron afectadas, en menor medida, la acetogénesis de etanol, que se acumuló a concentraciones superiores a 75 mg L⁻¹, y la oxidación anaerobia de lactato, cuya acumulación sucedió a concentraciones superiores a 100 mg L⁻¹.

Los datos experimentales se utilizaron para modelizar tanto la metanogénesis como la degradación de 246TCP. La metanogénesis se modelizó separando los términos de producción de metano a partir de acetato (acetoclástica) e hidrógeno (hidrogenotrófica) y simplificando la velocidad de producción de metano a una ecuación de pseudo-primer orden. La ecuación cinética de la metanogénesis acetoclástica fue modificada mediante la adición de un término de inhibición acompetitiva. El ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto mostró valores de los parámetros muy similares en ambos reactores, por lo que se puede afirmar que el 246TCP ejerce una acción inhibitoria en la metanogénesis acetoclástica muy parecida sobre ambos lodos.

La biodegradación completa de 246TCP se alcanzó, en ambos reactores, sólo en el ensayo con una concentración inicial de 50 mg 246TCP L⁻¹ en ambos reactores. Para concentraciones mayores se acumularon cantidades progresivamente crecientes de 246TCP debido a fenómenos de inhibición. En todos los casos se observó la aparición de intermedios de *orto*-decloración (24DCP y 4CP). Aunque no se puede descartar la presencia de *para*-

decloración, los procesos *orto*-declorativos fueron claramente mayoritarios. Además, se observó que una parte importante del 246TCP eliminado se debió a fenómenos adsorptivos. La evolución de 246TCP y sus principales intermedios de degradación (24DCP y 4CP) se modelizó en el ensayo a 50 mg L⁻¹. La desaparición de 246TCP se explicó mediante un proceso de adsorción (pseudo-segundo orden) y un proceso de biodegradación tanto de la fracción en disolución como de la adsorbida en el lodo (Monod). La decloración de 24DCP a 4CP se modelizó mediante el modelo de Monod. Aunque los valores de los parámetros de ajuste al modelo propuesto fueron bastante parecidos con ambos lodos, la constante de Monod fue significativamente menor en el lodo bioaumentado, por lo que se puede afirmar que la bioaumentación mejora la afinidad del lodo por el compuesto.

OBJETIVOS Y ALCANCE DEL TRABAJO



Monte Everest. Himalaya. Nepal.

Mi práctica como científico es atea. Esto es, cuando construyo un experimento supongo que ningún dios, ángel o demonio va a interferir en su curso, y esta suposición ha sido justificada por tanto éxito como he sido capaz de lograr en mi carrera profesional. Por consiguiente sería intelectualmente deshonesto si no fuera también ateo con respecto a los demás asuntos del mundo.

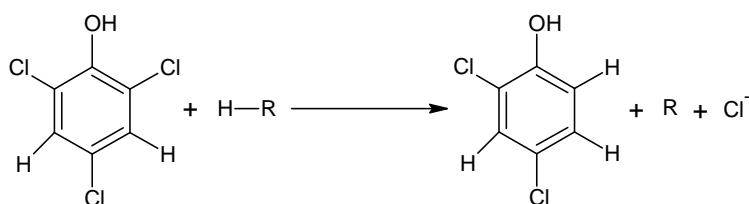
J. B. S. Haldane

La presencia de compuestos aromáticos halogenados en aguas residuales o naturales constituye un problema de primer orden debido a su peligrosidad. Entre el amplio abanico de compuestos aromáticos tóxicos, los clorofenoles constituyen una parte muy relevante dada su utilidad como materias primas en la fabricación de productos conservantes y biocidas o como productos finales para uso directo, debido a sus idóneas propiedades como disolventes, reactivos e intermedios de diversas reacciones de síntesis. Además, éstos compuestos pueden aparecer en forma de residuos de operaciones industriales tales como el blanqueo de pulpa de papel. La multiplicidad de orígenes de los clorofenoles origina que puedan contaminar tanto aguas residuales como cauces naturales o aguas subterráneas. Su hidrofobicidad, que facilita su interacción (adsorción o absorción) con los sistemas biológicos, es el origen de los efectos negativos que causan sobre la salud humana y el medioambiente (bioacumulación, toxicidad directa o efectos cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos).

Desde hace más de dos décadas se han venido empleando diversas tecnologías para eliminar clorofenoles del agua, y su desarrollo exponencial en los últimos años ha permitido obtener resultados prometedores, que facilitan el planteamiento de medidas a gran escala.

La biotecnología anaerobia aplicada a la descontaminación de aguas residuales contaminadas por compuestos tóxicos ha tenido una gran acogida a escala industrial, lo que se ha visto reflejado en la proliferación de reactores anaerobios de alta eficiencia, como los reactores UASB, siendo ésta una de las tecnologías más extendidas para la descontaminación de aguas residuales de origen industrial.

Los clorofenoles son biodegradados en condiciones anaerobias mediante un proceso denominado decloración reductiva, resumido en la siguiente reacción química:



El fenol resultante de la completa decloración es mucho más biodegradable y menos tóxico que los clorofenoles de partida, por lo que el principal objetivo en la biodegradación

anaerobia de clorofenoles es lograr alcanzar el máximo grado de dechloración. En la actualidad, los sistemas estudiados para el tratamiento de fenoles policlorados no permiten la completa dechloración del anillo fenólico, generando como productos finales monoclorofenoles que, aunque poseen menor toxicidad que los compuestos de partida, su concentración permitida en aguas residuales está también muy restringida en la legislación.

El objetivo principal de esta Tesis es el estudio de la biodegradación anaerobia en fase acuosa de 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol, ampliamente utilizados en la industria. La principal aplicación de estos clorofenoles es la síntesis de biocidas, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, aunque pueden aparecer como productos secundarios residuales en operaciones de cloración en la que se empleen disolventes orgánicos aromáticos.

El objetivo principal se particulariza en los siguientes objetivos concretos:

- 1) Estudio de la degradación de 2,4-diclorofenol mediante reactores anaerobios de alta eficiencia, evaluando la estabilidad de los mismos para elevadas velocidades de carga de 2,4-diclorofenol.
- 2) Evaluación de la toxicidad de 2,4-diclorofenol sobre lodo granular anaerobio, delimitando las rutas metabólicas anaerobias más afectadas por el compuesto y centrando especial atención en la metanogénesis.
- 3) Determinación de la cinética de degradación de 2,4-diclorofenol empleando lodo granular anaerobio adaptado a este compuesto mediante ensayos en discontinuo.
- 4) Optimización de la degradación de 2,4,6-triclorofenol, empleando diferentes cosustratos carbonosos habitualmente utilizados en condiciones anaerobias.
- 5) Evaluación de la toxicidad de 2,4,6-triclorofenol sobre lodo granular anaerobio no adaptado y estudio cinético de la degradación de dicho compuesto y de la inhibición de la metanogénesis.
- 6) Estudio de la degradación de 2,4,6-triclorofenol mediante reactores anaerobios de alta eficiencia y evaluación del efecto de la bioaumentación con bacterias halorespiradoras del género *Desulfitobacterium*.

- 7) Estudio de la microbiota en reactores anaerobios de alta eficiencia, determinando la evolución de las bacterias pertenecientes al género *Desulfotibacterium* y de las arqueas metanogénicas presentes en los reactores mediante el empleo de técnicas de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes.
- 8) Determinación de la cinética de eliminación de 2,4,6-triclorofenol y de la metanogénesis empleando lodo granular adaptado a la degradación del compuesto y bioaumentado con *Desulfotibacterium*.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN



*El universo no es sólo más misterioso de lo que imaginamos,
es más misterioso de lo que podemos imaginar.*

J. B. S. Haldane

PREFACIO

Uno de los principales problemas mundiales de salud pública es la falta de acceso a agua potable. Cerca de 1200 millones de personas carecen de acceso a agua segura y 2600 millones consumen agua de calidad ínfima, lo que ha provocado una cantidad ingente de muertes cada año (cerca de 3900 niños por día) a causa de la ingestión, prolongada o no, de aguas contaminadas (tóxicas o infecciosas), siendo ésta una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo, por encima de la desnutrición, los conflictos armados o las catástrofes ambientales ([Shannon et al., 2008](#)).

El agua, debido a sus características físico-químicas únicas y a su relativa inagotabilidad, es una materia prima esencial para el desarrollo agroindustrial. Por ello, las fuentes y cauces de agua han sido utilizados desde siempre como sumideros y vertederos de todo tipo de residuos. Tanto en países en desarrollo como industrializados, el uso masivo del agua como fuente de riqueza ha causado su contaminación a través de compuestos tradicionales (materia orgánica de deshecho y metales pesados) o microcontaminantes emergentes (disruptores endocrinos, nitrosaminas, herbicidas o fármacos, entre otros). Este hecho ha provocado en el ámbito político internacional la necesidad del tratamiento, lo que se ha traducido en el desarrollo de tecnologías cada vez más complejas que tienden a combinar altas eficiencias de tratamiento con bajos costes de operación y mantenimiento.

1.1 Los compuestos clorofenólicos

Los compuestos clorofenólicos son un importante grupo de contaminantes que pueden encontrarse en sedimentos, aguas residuales, aguas subterráneas, suelos y en gases emitidos por diversas industrias. Se obtienen a partir de **halogenación electrofílica** de fenol en un gran número de procesos industriales. Este proceso se ve acelerado con la utilización de disolventes polares debido a la disociación de fenol, ya que los aniones fenóxido son más susceptibles al ataque electrofílico debido a su mayor riqueza en electrones. Son considerados compuestos recalcitrantes y presentan diferentes grados de toxicidad para el ser humano y el medioambiente en función del número y la posición de los grupos cloruro, por lo que se han incluido en la mayoría de las legislaciones medioambientales internacionales, tales como la Lista de Contaminantes Prioritarios de la US-EPA, en las diferentes Directivas Europeas sobre aguas residuales, en la Ley de Control de la Polución del Agua japonesa o en la Lista Prioritaria sobre “compuestos químicos preocupantes” australiana.

1.1.1 Usos y aplicaciones

Los clorofenoles incluyen el pentaclorofenol (PCP), tetraclorofenoles (TeCP), triclorofenoles (TCP), diclorofenoles (DCP) y monoclorofenoles (MCP). Los clorofenoles, junto a los PCBs, son los compuestos fenólicos más producidos en la industria. La producción mundial de clorofenoles se ha estimado en torno a $2 \cdot 10^5$ toneladas en 1989. Estos compuestos son introducidos por el hombre en el medio a través de su uso como biocidas.

El 4CP ha sido utilizado como antiséptico en hogares, hospitales y granjas. Además, se utiliza en la preparación de pinturas. El 24DCP y el 245TCP han servido como intermediarios en la fabricación de los herbicidas 24D y 245T. El PCP, junto con isómeros de TCP y TeCP, han sido históricamente utilizados como fungicidas en la composición de preservantes de la madera (Field y Sierra-Alvarez, 2008). El PCP también ha sido utilizado como herbicida, sobre todo en Estados Unidos y Japón, hasta su prohibición en 2005 durante el **Convenio de Róterdam**.

En aguas industriales, los valores típicos de concentración de clorofenoles se sitúan entre decenas y cientos de mg L^{-1} . En aguas residuales urbanas y aguas agrarias se pueden detectar clorofenoles en concentraciones que van desde cientos de $\mu\text{g L}^{-1}$ hasta algunos mg L^{-1} (Annachhatre y Gheewala, 1996). Se han detectado grandes concentraciones de clorofenoles en las aguas residuales de la industria papelera, concretamente en el blanqueo de la pulpa de papel. En las etapas finales del **proceso Kraft** de blanqueo de la pulpa, el más extendido actualmente con un 80% de la producción mundial de papel, se utiliza tanto cloro gas como sales de hipoclorito y dióxido de cloro para eliminar los restos de lignina. Durante estas etapas, la reacción del cloro con la lignina da lugar a anillos aromáticos clorados, entre los que se encuentran los clorofenoles, las dioxinas y los furanos (Katadis y Gordan, 1987).

1.1.2 Toxicidad

Los clorofenoles son tóxicos, carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos. A nivel celular, el mecanismo principal de toxicidad de los clorofenoles se basa en su actuación como desacoplantes de la **fosforilación oxidativa** en la mitocondria (Liu y Tay, 2001). Además, debido a su alto grado de hidrofobicidad, se adsorben con facilidad en la membrana celular, perturbando el gradiente de protones intermembranal e interfiriendo en la **transducción energética celular**. Todo ello provoca la ausencia de crecimiento celular debido al desacoplamiento entre los ciclos catabólico y anabólico. La toxicidad de los clorofenoles hacia los animales superiores parece estar relacionado con el grado de cloración, siendo más tóxicos cuanto mayor número de cloros presenta su estructura (Chen et al., 2008). La explicación radica en que los compuestos más clorados (como el PCP y los TCPs) provocan **necrosis celular**, que puede contaminar otras células y generar tumoraciones. En cambio, la acción de los monoclorofenoles provoca mayoritariamente la muerte celular por **apoptosis**, con lo que las células que las rodean no se ven afectadas (Chen et al., 2004). Por otro lado, se conoce que la exposición crónica a clorofenoles provoca **disrupción endocrina**, disminuyendo el grado de fertilidad en ratas (Aoyama et al., 2005).

Se han dado casos de contaminación humana por pesticidas clorofenólicos en los que se ha detectado un aumento de **anemia aplástica**, **aplasia pura de la serie roja**, **leucemia**, **linfoma** y otros desórdenes hematológicos. En Malasia, debido al uso

indiscriminado de pesticidas en campos de cultivo, en 1993 se produjeron 400 muertes de 1400 casos de envenenamiento. El 74% de los casos correspondieron a niños menores de 10 años, cuyas zonas de recreo se situaban próximas a los campos de cultivo envenenados (<http://group9pollution.blogspot.com/2007/08/malaysia-pesticide-poisoning.html>). Mediante estudios epidemiológicos, la US-EPA ha concluido recientemente que el PCP, los TeCP y, en menor medida, el resto de clorofenoles, son agentes causantes de cánceres poco habituales como el **linfoma no Hodgkin** o el **mieloma múltiple** (Cooper y Jones, 2008).

1.1.3 Caracterización del 2,4-diclorofenol

El 24DCP es un compuesto químico sintético utilizado mayoritariamente en el proceso de elaboración del 24D, que es uno de los herbicidas más utilizados actualmente. Su uso se extiende asimismo como intermediario en la elaboración de otros herbicidas, insecticidas, preservantes de la madera, antisépticos y desinfectantes. La estructura y propiedades físicas y químicas del 24DCP se presentan en la Figura 1.1.

El 24DCP es un compuesto tóxico que está encuadrado dentro de la **lista de contaminantes prioritarios** de la Agencia de Protección del Medioambiente de Estados Unidos (US-EPA). Su ficha internacional de seguridad química tiene el código ISCS 0438 y el número AS: 120-83-2. Además, está recogido dentro del **Real Decreto 9/2005**, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados (*BOE. núm. 15, de 18 de enero de 2005*). En este RD se establece un límite de concentración de 24DCP en suelo en función del tipo de uso (en mg 24DCP Kg⁻¹ de peso seco): 10 para uso industrial, 1 para uso urbano y 0,1 para otros usos. En la Comunidad de Madrid, este compuesto está recogido en la **Ley 10/1993**, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento (*BOE. núm. 312, de 30 de diciembre de 1993*, rectificado en *BOE. núm. 86, de 11 de Abril de 1995*; *BOCM núm. 269, de 12 de noviembre de 1993*).

En cuanto a la toxicidad para el ser humano, el 24DCP puede producir efectos tóxicos sobre el sistema cardiovascular, el sistema endocrino y el sistema inmunológico. Asimismo, tiene efectos teratogénicos y mutagénicos. Este compuesto está encuadrado dentro de los compuestos tóxicos más peligrosos en 6 de los 12 sistemas de clasificación

homologados en Estados Unidos. La US-EPA ha recomendado extrema precaución en su manipulación, sobre todo debido a su toxicidad en contacto con la piel.

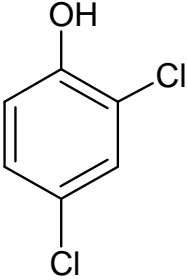
Estructura	Característica	Valor
	Nombre	2,4 Diclorofenol
	Sinónimos	24DCP; Isobac; 1-hidroxí-2,4 Diclorobenceno; 2,4-Diclorohidroxibenceno
	Fórmula molecular	$\text{Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{OH}$
	Peso molecular	163 g/mol
	Punto de ebullición	210°C
	Punto de fusión	45°C
	Solubilidad en agua	0,5 g/100 mL a 20°C
	Presión de vapor	133 kPa a 53°C
	Densidad relativa de vapor	5,6 (aire=1)
	Punto de inflamación	114°C
	Coefficiente de reparto octanol/agua	3,06 log Pow

Figura 1.1: Estructura y características físicas y químicas del 24DCP.

Por estas razones, el tratamiento de medios naturales (aguas y suelos) contaminados con 24DCP debe tenerse en cuenta. Asimismo, es recomendable favorecer la aplicación de tecnologías que permitan minimizar la liberación de este compuesto.

1.1.4 Caracterización del 2,4,6-triclorofenol

El 246TCP se usa como conservante de textiles, cuero y madera, y como precursor en la síntesis de los biocidas 2346TeCP y del PCP. Este compuesto está catalogado como contaminante prioritario en la **Lista de la US-EPA** y en la **Directiva 76/464/CEE** sobre vertidos peligrosos en medio acuático (Lista I, organohalogenados). La estructura y propiedades físicas y químicas del 246TCP se presentan en la Figura 1.2.

En lo referente a la Legislación Española, el 246TCP está englobado en los anexos de sustancias tóxicas y peligrosas de la **Ley 20/1986**, Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos y del **Real Decreto 833/1988**, que la complementa. También se encuentra en el

Anexo 3 de la **Ley 16/2002**, de Prevención y Control integrados de la Contaminación, en la lista de las principales sustancias contaminantes que se tomarán obligatoriamente en consideración si son pertinentes para fijar valores límite de emisiones. Los niveles de referencia para el 246TCP se concretan los Anexos V y VI del **Real Decreto 9/2005**, de 14 de enero, por el que se establece la relación de Actividades Potencialmente Contaminantes del Suelo. En la Comunidad de Madrid, este compuesto está englobado en la **Ley 10/1993**, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento.

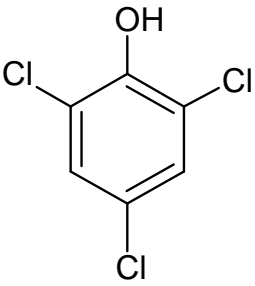
Estructura	Característica	Valor
	<i>Nombre</i>	2,4,6-Triclorofenol
	<i>Sinónimos</i>	246TCP; TCP, fenaclor, Dowicide 2S, Dowicide 2S, omal
	<i>Fórmula molecular</i>	$\text{Cl}_3\text{C}_6\text{H}_3\text{OH}$
	<i>Peso molecular</i>	$197,5 \text{ g mol}^{-1}$
	<i>Punto de ebullición</i>	246°C
	<i>Punto de fusión</i>	$69,5^\circ\text{C}$
	<i>Solubilidad en agua</i>	Despreciable
	<i>Presión de vapor</i>	133 Pa a $76,5^\circ\text{C}$
	<i>Densidad relativa de vapor</i>	6,8 (aire=1)
	<i>Coefficiente de reparto octanol/agua</i>	3,87 log Pow

Figura 1.2: Estructura y características físicas y químicas del 246TCP.

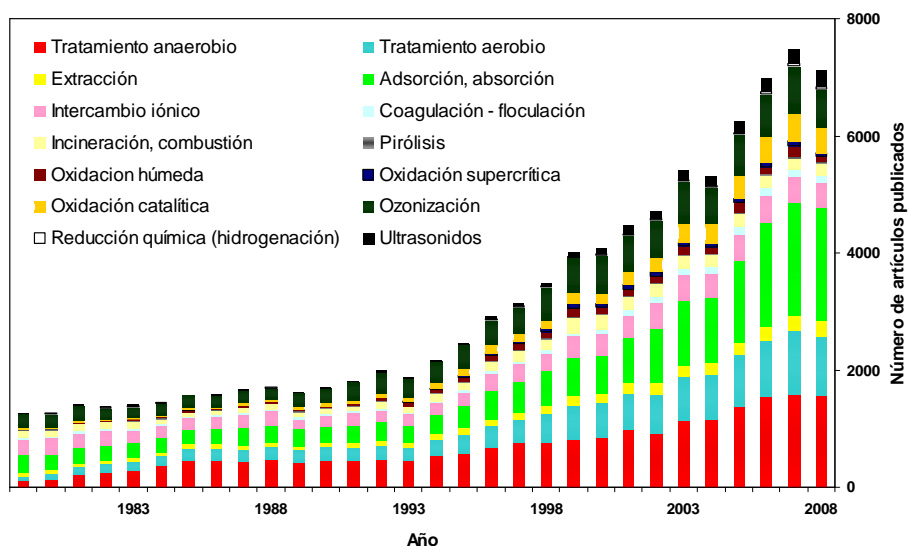
El 246TCP es nocivo por ingestión, irrita los ojos y la piel y tiene efectos cancerígenos en animales. Los efectos crónicos pueden comportar acortamiento de la vida, problemas de reproducción, pérdida de fertilidad y cambios de la apariencia y del comportamiento. Es además muy tóxico para los organismos acuáticos. La US-EPA ha recomendado extrema precaución en su manipulación, sobre todo debido a su toxicidad en contacto con la piel.

1.2 Tratamiento de aguas residuales industriales y aplicaciones en la eliminación de clorofenoles

El **agua residual** se define como toda corriente líquida desechada en la que el eluyente es el agua, y que contiene materia disuelta o en suspensión que proviene de cualquier actividad humana. Los cauces naturales poseen una limitada capacidad de autodepuración de las aguas contaminadas. Cuando, debido al desarrollo humano, el flujo de agua residual es superior a esta capacidad natural, es necesario tratarla de manera que no suponga un riesgo para el medioambiente o la salud pública.

La clasificación de las tecnologías de tratamiento de aguas industriales se basa en la forma de eliminar los compuestos residuales del agua. Cuando el contaminante se transfiere a otra fase, se habla de **tecnologías no destructivas**, mientras que si el tratamiento implica la eliminación del contaminante, se habla de **tecnologías destructivas**. En la Figura 1.3 se muestra la evolución del esfuerzo de investigación realizado a nivel mundial en cada tecnología desde 1979. Los métodos térmicos están en declive, mientras que las tecnologías dominantes son los métodos biológicos, tanto aerobios como anaerobios. Algunas tecnologías químicas se encuentran actualmente en periodo de desarrollo y expansión, como la oxidación húmeda y avanzada, mientras que otras están empezando a germinar (hidrogenación catalítica, ultrasonidos). En la Figura 1.4 se muestra el intervalo de aplicación de las tecnologías más empleadas para el tratamiento de aguas residuales industriales en función del caudal de agua tratado y de la concentración de materia orgánica, expresada como DQO.

La **tecnología ambiental** ha sido un agente efectivo para el tratamiento de compuestos clorofenólicos en aguas residuales industriales desde que comenzó la preocupación por la toxicidad de estos compuestos, a principios de los años 80. Desde entonces, se han venido desarrollando tecnologías con diversos grados de complejidad y eficiencia. En la Figura 1.5 se presenta un resumen de las principales tecnologías utilizadas. Actualmente existen numerosos estudios que combinan con éxito la utilización de dos o más de estas tecnologías, principalmente tecnologías químicas oxidativas con tecnologías aerobias y tecnologías aerobias con anaerobias, como se verá con posterioridad.



DISTRIBUCIÓN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS (1979-2009)

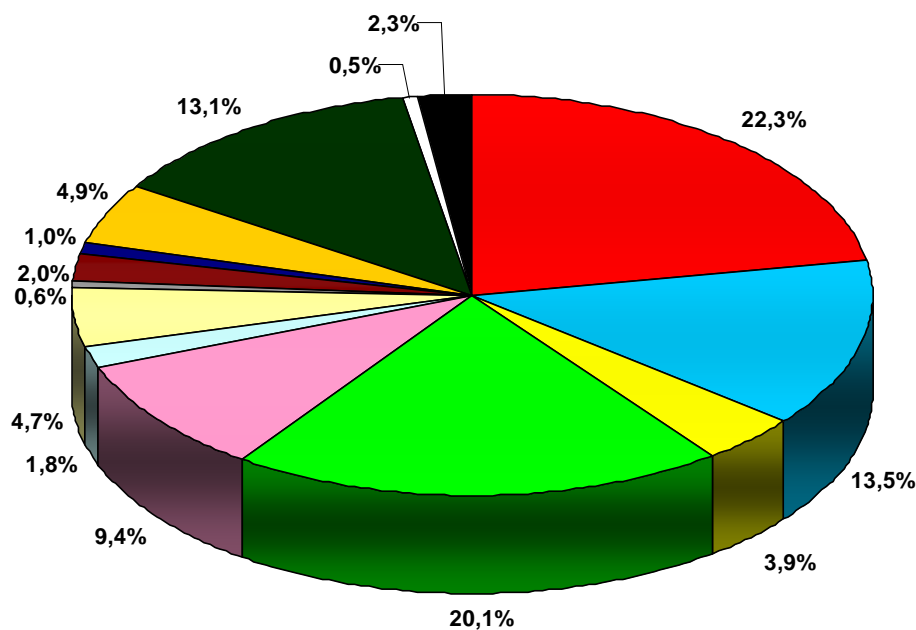


Figura 1.3: Evolución del esfuerzo en investigación realizado a nivel mundial en el periodo 1979-2009 sobre las diferentes tecnologías aplicadas al tratamiento de aguas residuales industriales (Fuente: [SciFinder Scholar](#)®).

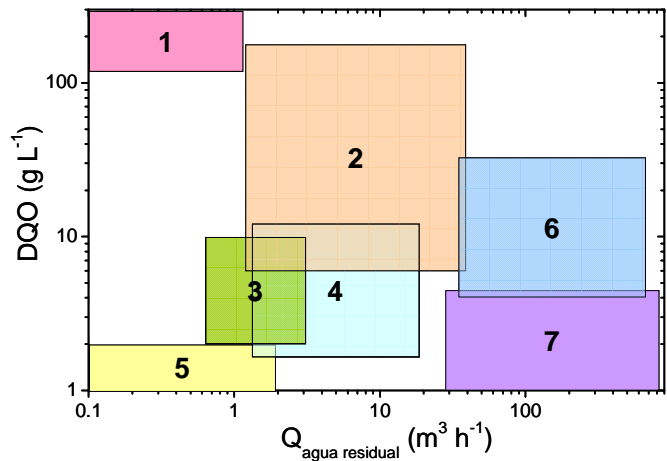


Figura 1.4: Intervalo de aplicación de las principales tecnologías de tratamiento de aguas residuales industriales. (1) Incineración. (2) Oxidación húmeda. (3) Oxidación avanzada. (4) Oxidación húmeda catalítica. (5) Adsorción. (6) Tratamiento biológico anaerobio. (7) Tratamiento biológico aerobio.

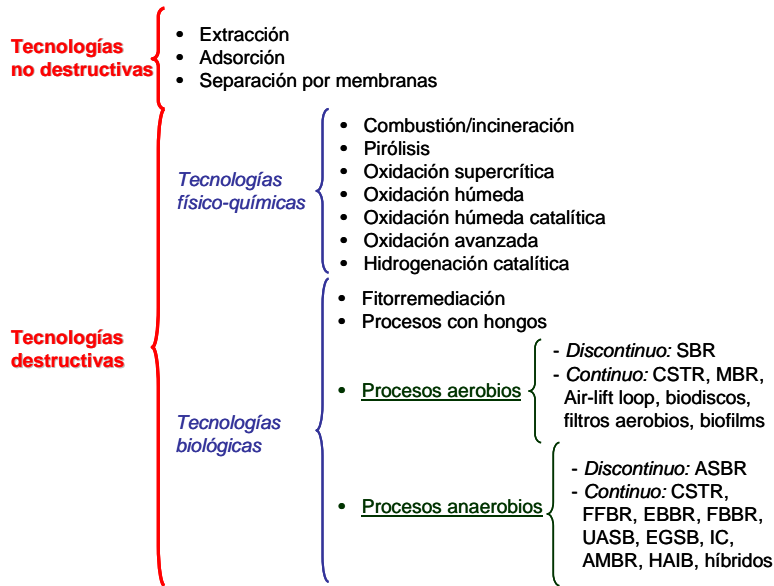


Figura 1.5: Tecnologías de tratamiento de compuestos clorofenólicos en aguas residuales industriales.

1.2.1 Tecnologías no destructivas

1.2.1.1 Descripción de las tecnologías no destructivas

Las **tecnologías no destructivas** son aquellas que retiran los compuestos contaminantes del agua residual y los concentra en otra fase. En algunos casos, estos tratamientos van encaminados a la recuperación de compuestos residuales valiosos, como pueden ser metales pesados en plantas de tratamiento de aguas de hidrometalurgia ([Habashi, 2005](#)), pero generalmente se genera un residuo altamente concentrado que es necesario gestionar adecuadamente.

La **adsorción** es una de las tecnologías no destructivas más estudiada. Se basa en la interacción de los compuestos residuales con una fase sólida generando fuerzas moleculares mayores que la interacción entre los compuestos y el agua, por lo que quedan retenidos en dicha fase. La fase sólida más utilizada en los procesos de adsorción ha sido el carbón activo, por su elevada capacidad de adsorción, debida a la presencia de grupos activos sobre la superficie del carbón y a la elevada área superficial. Además, este material es muy estable tanto química como térmicamente ([Qu, 2008](#)). La principal desventaja de los procesos de adsorción es la necesidad de un post-tratamiento sobre el adsorbente para romper la unión con el adsorbato, generando una corriente, líquida o gaseosa, altamente concentrada.

El **intercambio iónico** se utiliza para eliminar compuestos cargados eléctricamente o que presentan alto grado de polaridad. Éstos compuestos pueden ser retenidos en columnas provistas de sólidos inertes con cargas opuestas a las de los contaminantes. Su uso es apropiado para la eliminación de cationes metálicos ([Calvo et al., 2009a](#)).

Los procesos de **filtración** se basan en la separación de contaminantes del agua residual al hacerla pasar por un medio filtrante (filtro o columna de filtración) en el que quedan retenidos. Las técnicas de filtración más avanzadas actualmente son la **ultrafiltración** y la **ósmosis inversa** ([Sablani et al., 2001](#)), comúnmente utilizadas para la potabilización y desalinización de aguas.

La **extracción líquido-líquido** es otra tecnología no destructiva utilizada en el tratamiento de aguas residuales industriales. Consiste en la mezcla y posterior separación de agua residual con disolventes orgánicos donde quedan retenidos los contaminantes. El problema principal de esta tecnología es el gasto de disolvente, que hace inviable su aplicación para caudales relativamente altos.

1.2.1.2 Aplicación de tecnologías no destructivas en la eliminación de clorofenoles

Entre las tecnologías no destructivas aplicadas al tratamiento de clorofenoles en fase acuosa, la más extendida es la adsorción. El carbón activo se ha empleado para eliminar numerosos compuestos clorofenólicos, como 2CP (Aktas y Cecen, 2007), 4CP (Hameed et al., 2008a), 24DCP (Ghatbandhe y Yenkie, 2008), 246TCP (Tan et al., 2009a) o PCP (Leyva-Ramos et al., 2007). La procedencia de estos carbones inicialmente ha sido comercial (Hu et al., 1998), aunque en la actualidad existen numerosos estudios que plantean la obtención de carbones activos a partir de materiales de deshecho (Ahmaruzzaman, 2008), como serrín de juncos (Hameed et al., 2008a), lodo de deshecho de la producción de fertilizantes (Srivastava y Tyagi, 1995), corcho (Mourao et al., 2006), cáscara del fruto de la palma (Tan et al., 2009b), cáscara de coco (Hameed et al., 2008b), paja de arroz (Wang et al., 2007a), mazorca de maíz (Sathishkumar et al., 2009) o cenizas volantes procedentes de plantas termoeléctricas (Estevinho et al., 2007), entre muchos otros. Otros adsorbentes utilizados han sido silicatos templados como el MCM-41 (Mangrulkar et al., 2008), partículas de TiO₂ (Wahab et al., 2008), resinas poliméricas como la amberlita xad-4 (Bilgili, 2006), organoarcillas (Pernyesci et al., 2006), sílice y arcillas del tipo montmorillonitas (Backhaus et al., 2001), nanotubos de carbono (Chen et al., 2009), espumas de poliuretano (Neng et al., 2007), adsorbentes dolomíticos (Marouf et al., 2006) o magnetita (Xue et al., 2009), entre otros.

La extracción líquido-líquido se ha empleado para la separación de clorofenoles, aunque en la actualidad su uso ha quedado restringido para métodos analíticos de separación (Lin and Huang, 2008). Los procesos de separación de clorofenoles por membranas han experimentado un avance debido al desarrollo de procesos de emulsión líquida con membranas (Park et al., 2006).

1.2.2 Tecnologías destructivas

Las tecnologías destructivas se basan en la transformación química o biológica de los contaminantes en compuestos inocuos. Estas transformaciones pueden ser realizadas mediante métodos térmicos, químicos (bien en condiciones oxidantes o reductoras) o mediante métodos biológicos (tanto aerobios como anaerobios).

1.2.2.1. Métodos térmicos

Los tratamientos térmicos son viables únicamente para caudales de agua residual menores de $1 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. La **incineración** o **combustión** es el método térmico más antiguo, aplicable cuando la concentración del contaminante en el agua residual es superior a 100 g L^{-1} . La temperatura óptima de incineración se sitúa en torno a $1000\text{-}1200 \text{ }^\circ\text{C}$. El inconveniente principal es el gasto de combustible. Además, si la combustión no es completa, pueden aparecer en los productos gaseosos compuestos tóxicos como dioxinas o furanos.

La **pirólisis** es un tratamiento térmico que opera en ausencia de oxígeno, por lo que no se generan compuestos tóxicos oxidados. La temperatura es sensiblemente inferior a la utilizada en la combustión ($700\text{-}900 \text{ }^\circ\text{C}$), y pueden obtenerse biocombustibles y aceites lubricantes (Deng et al., 2008). En cambio, es necesario un aporte mayor de energía para llevarse a cabo, dado que los procesos pirolíticos son altamente endotérmicos. Además, los residuos sólidos generados (asfaltos) son de difícil ubicación.

1.2.2.2. Métodos químicos

Los métodos químicos se clasifican en función de las condiciones redox en las que operan. Así, se denominan **métodos químicos de reducción** si los contaminantes son reducidos hasta hidrocarburos de cadena corta y gases como el N_2 o el CH_4 . A su vez, se denominan **métodos químicos de oxidación** cuando los contaminantes son oxidados hasta CO_2 y H_2O , principalmente, por compuestos como el O_3 , H_2O_2 o radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$).

i) Métodos químicos de reducción

Los procesos de reducción consisten en el uso de agentes reductores mediante el empleo de catalizadores. El agente reductor más utilizado es el hidrógeno, aunque existen otros como los hidruros metálicos, el ácido fórmico, la hidracina y los alcóxidos. Los tratamientos reductores más empleados en la industria son la **hidrogenación**, **hidrodesulfuración**, **hidrodesnitrificación**, **hidrodesoxigenación** e **hidrodeshalogenación**. En general, estos procesos (a excepción de la hidrodecloración y en menor medida la hidrodesnitrificación) no se han aplicado a la eliminación de contaminantes en aguas (Bautista, 2008).

Uno de los procesos más estudiados de hidrogenación es la **hidrodecloración**, en la que el cloro del enlace carbono-cloro es sustituido por un átomo de H, generando HCl, que acidifica el medio. Esta reacción requiere gran cantidad de energía de activación, por lo que la utilización de catalizadores es imprescindible. Los más comúnmente utilizados son los metales nobles (rodio, paladio y platino) soportados sobre carbón activo, alúmina o zeolitas. Se ha estudiado la hidrodecloración de compuestos clorados presentes en aguas residuales industriales, tanto alifáticos (Kovenklioglu et al., 1992) como aromáticos (Calvo, 2004; Calvo et al., 2004, 2006; Díaz et al., 2007, 2008, 2009).

ii) Métodos químicos de oxidación

Los procesos de oxidación se diferencian en función del tipo de agente oxidante utilizado y las condiciones de presión y temperatura en las que operan. En los procesos de **oxidación húmeda** el agente oxidante es el O₂, mientras que las condiciones en las que operan se sitúan en torno a 150-320 °C y 20-200 bar. Son métodos muy rápidos, aunque tienen el inconveniente del gasto energético elevado y la generación de compuestos tóxicos como dioxinas y furanos (Kolaczowski et al., 1999).

Para suavizar las condiciones de operación se pueden utilizar catalizadores, dando así lugar a los procesos de **oxidación húmeda catalítica**. Aunque se disminuye el gasto energético, se precisa del aporte de catalizadores, lo que normalmente implica un elevado

gasto adicional, y el riesgo de generación de contaminantes secundarios es también elevado (Levec y Pintar, 2007).

Para evitar la generación de compuestos tóxicos se puede emplear un medio de oxidación en **condiciones supercríticas** (Verianshyah y Kim, 2007). Como medios de reacción se han utilizado sobre todo el H_2O (Shin et al., 2009) y el CO_2 (Sato et al., 2007). Las condiciones de presión y temperatura necesarias para poder obtener el estado supercrítico hacen que estos métodos sean excesivamente caros, por lo que hasta ahora apenas se han desarrollado a nivel industrial.

Entre los métodos químicos de oxidación, los procesos de **oxidación avanzada** suponen un avance importante, ya que no necesitan alcanzar condiciones de presión y temperatura elevadas. La característica fundamental de estos procesos es la generación de radicales libres (principalmente radicales hidroxilo), que poseen un elevado poder oxidante. Estos radicales hidroxilo se pueden generar por métodos **fotoquímicos**, empleando radiación electromagnética y **no fotoquímicos**, que emplean energía química u otras formas energéticas, como ultrasonidos.

Los **procesos fotoquímicos** han sido utilizados para el tratamiento de aguas industriales, bien empleando únicamente luz UV (Al-Momami et al., 2002), o bien combinando UV con H_2O_2 (Shu y Chang, 2005), O_3 (Gong et al., 2008), reactivo Fenton (Ballesteros-Martín et al., 2008a, 2008b, 2009a, 2009b) o empleando catalizadores semiconductores (Rodrigues et al., 2008). El inconveniente principal de estos métodos es el gasto energético y el coste del material requerido para producir luz UV, lo que limita su aplicabilidad con caudales inferiores a $5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$.

Entre los **procesos no fotoquímicos**, el más utilizado en el tratamiento de aguas residuales industriales es la ozonización, el cual puede realizarse en medio alcalino (Bennet, 2006), o bien combinando el O_3 con H_2O_2 (Yang et al., 2001). Otros procesos no fotoquímicos utilizados para estos fines son la oxidación electroquímica (Khansorthong y Hunsom, 2009), los procesos con haces de electrones (Kim et al., 2007), el plasma no térmico (Yang et al., 2009) o los ultrasonidos (Naddeo et al., 2009). El **proceso Fenton** es un método no fotoquímico que actualmente está teniendo un elevado grado de implantación debido al menor coste de operación que en procesos de oxidación no fotoquímicos (Zazo et al., 2005).

Además, el requerimiento en equipamiento es reducido y se opera en condiciones de presión y temperatura suaves (próximas a las ambientales). Se ha aplicado esta tecnología en el tratamiento de aguas residuales industriales (Bautista et al., 2007) y en la eliminación de compuestos recalcitrantes a tratamientos biológicos (Zazo et al., 2005, 2007). El proceso Fenton tiene algunos inconvenientes tales como el alto consumo de H_2O_2 y la necesidad de eliminar el hierro añadido, lo que añade etapas adicionales al tratamiento e incrementa el coste. Una variante del proceso Fenton consiste en la utilización de catalizadores heterogéneos, proceso denominado **oxidación húmeda catalítica con peróxido de hidrógeno** (Molina et al., 2006; Zazo et al., 2007; Bautista et al., 2010a, 2010b), que aunque disminuye el consumo de H_2O_2 , tiene el riesgo de pérdida de la fase activa por lixiviación si no se controla adecuadamente el pH del medio.

1.2.2.3. Aplicación de tecnologías destructivas en la eliminación de clorofenoles

Los métodos térmicos de oxidación, como la combustión y la pirólisis, han sido desechados para el tratamiento de clorofenoles debido a que estos procesos generan dioxinas policloradas. La combustión de varios TCPs, TeCPs y PCP en incineradores que trabajan con temperaturas entre 500-600 °C puede producir dibenzo *para*-dioxinas policloradas (Jansson et al., 1978). La pirólisis puede generar el mismo tipo de contaminantes clorados cuando se tratan compuestos como 2CP a 200-500 °C (Khachatryan et al., 2007), o 246TCP (Na et al., 2007).

Entre los procesos químicos de oxidación, las tecnologías basadas en la oxidación húmeda se han estudiado en profundidad para el tratamiento de diversos clorofenoles. Así, se ha estudiado la cinética de oxidación de 4CP a 120-180 °C y 5-15 bar incluyendo en las ecuaciones procesos tan rápidos y complejos como los periodos de inducción (García-Molina et al., 2007). También se han propuesto mecanismos de reacción en paralelo para la descomposición del 2CP trabajando a 160-190 °C y 5-40 bar con concentraciones entre 0,25 y 1,5 g L⁻¹ (Poulopoulos et al., 2007). La aplicación de catalizadores para rebajar la temperatura y presión en los procesos de oxidación húmeda ha resultado mucho más fructífera, por lo que el número de publicaciones recientes está en continuo aumento. Así, se ha degradado el 2CP

utilizando catalizadores de Ru/TiO₂ (Kojima et al., 2005), Ru/Ce_xZr_{1-x}O₂ (Li et al., 2007a), Ru/zirconita (Li et al., 2007b) o Mn(II)-MCM41 (Chaliha y Bhattacharyya, 2008); el 4CP con catalizadores de Pt/Carbón activo (Qin et al., 2001) o Ru/CrO₂ (Li et al., 2007c); el 24DCP utilizando catalizadores de Mn(II)-MCM41 (Chaliha y Bhattacharyya, 2008), Mn/Ce (Lee et al., 2002) o Fe(II)-, Co(II)- y Ni(II)-MCM41 (Chaliha y Bhattacharyya, 2009); o el 246TCP con catalizadores de óxidos de Mn-Ce (Abecassis-Wolfovich et al., 2007), entre otros. El precio de la mayoría de los catalizadores, sobre todo si se trata de metales nobles, impide su escalado a plantas piloto o aplicaciones industriales. La degradación de clorofenoles utilizando oxidación supercrítica ha sido también investigada, aunque alcanzar el punto crítico del agua (274 atm y 374 °C) conlleva un gasto importante de energía (Veriansyah y Kim, 2007) lo que, al igual que la oxidación húmeda, incluida su versión catalítica, ha frenado su desarrollo a escala industrial.

Los últimos procesos oxidativos por vía química en desarrollarse, los procesos de oxidación avanzada, han supuesto un salto cualitativo en la calidad de los resultados obtenidos para la oxidación de clorofenoles. Esto se debe a la disminución de la temperatura requerida, a la menor generación de compuestos secundarios como las dibenzo *para*-dioxinas policloradas y a menores requerimientos de reactivos (Pera-Titus et al., 2004). De esta manera, se han convertido en tecnologías prometedoras y rentables para el tratamiento de clorofenoles a concentraciones en torno a 0,1 g L⁻¹ y caudales reducidos (<5 m³ h⁻¹), por lo que su aplicabilidad está restringida a un número limitado de situaciones. La generación de radicales hidroxilo para la oxidación de clorofenoles ha sido satisfactoriamente aplicada empleando UV/H₂O₂ (Ghaly et al., 2001; Pouloupoulos et al., 2008), O₃/H₂O₂ (Pi et al., 2007), fotocatálisis heterogénea (Vijayan et al., 2009), electrólisis con pulsos de alto voltaje (Yin et al., 2009), UV/plasma no térmico (Hao et al., 2007), microondas/H₂O₂ (Klan y Vavrik, 2006), sonicación por ultrasonidos (Chowdhury y Viraraghavan, 2009), Fenton (Detomaso et al., 2003), Foto-fenton (Al-Momani et al., 2006) y radiólisis con haces de electrones (Trojanowicz et al., 2002).

Los procesos de reducción catalítica se han empleado principalmente utilizando hidrógeno como agente reductor del enlace cloruro de los clorofenoles y diferentes tipos de catalizadores, sobre todo metales nobles como el Pd (Calvo et al., 2009b), el Rh (Díaz et al., 2009) o el Pt (Molina et al., 2009). El tratamiento de 4CP con estas tecnologías ha sido el más

estudiado (Calvo et al., 2004, 2006, 2009b, Díaz et al., 2008, 2009). Aunque los primeros estudios sobre el tema datan de finales de los años 90 (Felis et al., 1999), esta tecnología está aún en estado emergente.

1.2.2.4. Métodos biológicos

El tratamiento biológico de aguas residuales industriales engloba todas las tecnologías que utilizan organismos vivos, principalmente bacterias, para la depuración de las aguas, bien sea mediante la **estabilización de la materia orgánica**, si el objetivo es la reducción de la DBO, o bien a través de la **detoxificación**, si se persigue eliminar compuestos tóxicos específicos, aunque en muchos casos ambos procesos funcionan simultáneamente. El inicio del desarrollo de las tecnologías biológicas para el tratamiento de aguas residuales industriales data de finales de los años 70 y principios de los 80, siendo una de las familias de tecnologías más antiguas. Debido a que operan con organismos vivos, su evolución es constante, por lo que son en la actualidad una de las tecnologías más estudiadas. La mejora en el control y automatización de los reactores biológicos, el avance en el conocimiento de los fenómenos de inhibición, el desarrollo de tecnologías moleculares para el control y seguimiento de los microorganismos implicados en el proceso y el asentamiento de las tecnologías de alta eficiencia han permitido que estos métodos abarquen un campo cada vez más amplio en el tratamiento de aguas residuales industriales, de manera que actualmente se están estudiando tratamientos biológicos en aguas catalogadas hasta hace relativamente poco tiempo como “no biodegradables”. Los sistemas de tratamiento biológico se dividen en **aerobios** y **anaerobios**. Éstos últimos serán tratados en profundidad en el apartado 1.3.

Tecnologías de tratamiento aerobias

Las aguas residuales con características para ser tratadas biológicamente han sido sometidas tradicionalmente a procesos de tipo aerobio, los cuales logran generalmente una eficaz mineralización de la materia orgánica. El coste de estas tecnologías se debe principalmente a la necesidad de aeración, y presentan como inconvenientes una elevada producción de lodos y una gran superficie necesaria para su implantación. A pesar de ello, han

aparecido tecnologías aerobias de alta eficiencia que han hecho disminuir en parte estos inconvenientes.

Los **reactores secuenciales discontinuos** (SBR) se basan en la secuenciación de ciclos de llenado, aeración, sedimentación y vaciado, por lo que se logra una importante reducción de superficie requerida al no necesitar sistemas de recuperación de fangos (sedimentadores). Este tipo de tecnologías se han utilizado con éxito para tratar cargas orgánicas bajas (Ng et al., 1993), medias (Flapper et al., 2001) y altas (Bernet et al., 2000).

Una variante de los tradicionales reactores aerobios de mezcla completa son los **reactores de membrana** (MBR). Estos sistemas permiten operar con incrementos del 50% en la concentración de microorganismos. Además, al igual que los SBR, se evita la utilización de decantadores debido a que el vaciado se realiza a través de membranas que evitan el paso de materia particulada. En España es una de las tecnologías por las que más fuerte se está apostando en el campo del tratamiento de aguas. El principal inconveniente de los MBR es la saturación de las membranas, que puede originar problemas de colmatación y de sobrepresión en las conducciones (Gander et al., 2000; Ng et al., 2007; Pearce, 2008).

En los reactores aerobios de discos rotativos o **reactores biológicos rotativos de contacto** (RBC), los microorganismos no crecen en suspensión, sino que se adhieren a la superficie de discos giratorios inmersos en tanques por los que circula el agua residual. La principal ventaja de estos sistemas es la escasa producción de lodo. Además, permiten tratar aguas residuales con contenidos relativamente elevados de compuestos tóxicos. Su inconveniente principal es el gasto energético del sistema de giro, que los hace inviables para tratar caudales elevados ($>100 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) (Cortez et al., 2008).

Los **reactores aerobios de circulación de aire**, habitualmente denominados *air-lift*, están provistos de barreras internas que provocan la recirculación del aire inyectado a los mismos, minimizando el gasto de aeración. La formación de espumas puede llegar a ser problemática en estos sistemas si no se controlan mediante desespumantes, lo que genera un gasto adicional (Cai, 1998; Merchuk et al., 2008).

1.2.2.5. Aplicación de métodos biológicos en la eliminación de clorofenoles.

i) Fitorremediación

La utilización de plantas para la detoxificación *in situ* de suelos contaminados data de mediados de los años 90, y su uso posee ciertas ventajas sobre los procesos bacterianos, como son su elevada capacidad de retención de xenobióticos o su flexibilidad económica. En cambio, en la mayoría de los casos las plantas no pueden metabolizar los compuestos tóxicos, por lo que únicamente se limitan a extraerlos del suelo y compartimentalizarlos en vacuolas o depositarlos en el apoplasto (Eapen et al., 2007). Se han utilizado tanto plantas terrestres (PCP, Mills et al., 2006) como algas (24DCP, Petroutsos et al., 2008) para la eliminación de clorofenoles.

ii) Procesos con hongos

Uno de los primeros estudios sobre la capacidad de los hongos para la biorremediación de aguas y suelos contaminados data de mediados de los años 80. Desde entonces, el esfuerzo investigador ha aumentado considerablemente para revelar la potencialidad biotecnológica de los hongos (Gadd, 2001). Los hongos son organismos aerobios, por lo que los mecanismos de degradación de clorofenoles se encuadran dentro de los procesos de oxidación biológica aerobia. La degradación de los clorofenoles a través de hongos puede realizarse mediante la sustitución de cloruros por grupos hidroxilo o bien mediante la metilación de grupos hidroxilo para facilitar la posterior oxidación de los anisoles resultantes (Szewczyk y Dlugonski, 2009). De esta forma, se han utilizado muchas especies de hongos para la degradación de clorofenoles. Así, se han empleado *Penicillium camemberti* en la degradación de PCP y 2CP (Taseli y Gokcay, 2005), *Mucor ramosissimus* en la biotransformación de PCP (Szewczyk y Dlugonski, 2009), *Phanerochaete chrysosporium* para la degradación de 4CP (Zouari et al., 2002) o para la biosorción y bioeliminación de 24DCP (Wu y Yu, 2007), o *Trametes Versicolor* para la biotransformación de 2CP en 2-cloro-1,4-benzoquinona (Grey et al., 1998), entre otras especies. Se conoce que la causa fisiológica de la degradación de clorofenoles mediante hongos radica en la síntesis de unos enzimas excretados al medio externo denominados lacasas, presentes también en algunas

plantas, los cuales catalizan la oxidación de los clorofenoles a menudo en conjunción con otros enzimas, como las Mn-peroxidasas (Mayer y Staples, 2002). Se han aislado, sintetizado y utilizado lacasas para la degradación de 24DCP (Zhang et al., 2009a) y para la eliminación conjunta de 24DCP, 4CP y 2CP (Zhang et al., 2008).

iii) Procesos con organismos procariotas

La utilización de organismos procariotas ha sido, con mucho, la estrategia biotecnológica más desarrollada para el tratamiento biológico de clorofenoles. Las principales razones de ello son el elevado grado de conocimiento de los procesos bioquímicos, la facilidad de obtención de biomasa debido a altas tasas de crecimiento procariota, sobre todo en organismos aerobios, la rapidez de adaptación de muchos tipos de procariotas a condiciones cambiantes, la gran diversidad de condiciones en la que pueden crecer y la elevada capacidad de modificación genética a través de transferencia horizontal de genes o mutación puntual. El tratamiento de clorofenoles con organismos procariotas es muy diferente en presencia o ausencia de oxígeno, ya que las rutas metabólicas en cada caso difieren enormemente, por lo que es necesario estudiar ambas condiciones de forma independiente.

Bajo condiciones aerobias, los procariotas degradan los clorofenoles con diversas estrategias metabólicas. Los procesos cometabólicos suceden cuando el medio de cultivo contiene fuente de carbono y energía suficiente para el mantenimiento de la biomasa. En estos casos, los clorofenoles son oxidados de manera paralela al consumo del sustrato, generando mayoritariamente clorocatecoles, que posteriormente son degradados a partir de la rotura del anillo aromático (Spain y Gibson, 1988). En ocasiones, la degradación del sustrato induce la formación de mono o dioxigenasas que facilitan la co-oxidación y la cometabolización de los clorofenoles. La inducción de estos procesos ha sido provocada con la utilización de compuestos aromáticos (Spain y Gibson, 1988; Bestetti et al., 1992; Koh et al., 1997), fenol (Cobos-Vasconcelos et al., 2006; Loh y Wu, 2006; Monsalvo et al., 2009) e incluso otros clorofenoles funcionando como sustrato principal (Yang et al., 2005a). Existen sustratos que no inducen la formación de oxigenasas, como la mayoría de los azúcares. A pesar de ello, se ha estudiado el cometabolismo de los clorofenoles utilizando estos sustratos (Banerji y

Bajpai, 1994; Wang y Loh, 1999), seguramente debido a la generación del NADH requerido por las oxigenasas (Wang y Loh, 1999).

Existe una gran variedad de microorganismos aerobios que son capaces de utilizar los clorofenoles como fuente única de carbono y energía. Así, se han utilizado cepas del género *Alcaligenes* spp. para el tratamiento de 2CP (Gallego et al., 2001) y 4CP (Balfanz y Rehm, 1991), *Pseudomonas* spp. en el tratamiento de 2CP (Goswami et al., 2005), 4CP (Wang et al., 2003), 24DCP (Hahn et al., 2007), 246TCP (Kiyohara et al., 1992) o PCP (Kao et al., 2005), *Rhodococcus* spp. para la degradación de PCP (Uotila et al., 1991) o *Streptomyces* spp. en la degradación conjunta de varios clorofenoles (Golovleva et al., 1991). Otros géneros reconocidos para la degradación aerobia de clorofenoles son *Arthrobacter* spp., *Sphingomonas* spp., *Comamonas* spp., *Nocardioides* spp., *Azotobacter* spp., *Rhodopseudomonas* spp. y *Mycobacterium* spp. (Field y Sierra-Álvarez, 2008). Existen dos estrategias principales de degradación de clorofenoles por vía aerobia (Figura 1.6). Los monoclorofenoles y diclorofenoles son atacados por monooxigenasas generando clorocatecoles, cuyo anillo es posteriormente abierto antes de la decloración (**vía de los clorocatecoles**, Figura 1.6a) (Finkel'shtein et al., 2000). Los clorofenoles policlorados (3-5 cloros), en cambio, son transformados en clorohidroquinonas, que posteriormente son sucesivamente decloradas antes de la rotura del anillo aromático (**vía de las clorohidroquinonas**, Figura 1.6b) (Steiert y Crawford, 1986). Los compuestos resultantes de las transformaciones aerobias de los clorofenoles (clorocatecoles y clorohidroquinonas) presentan toxicidades elevadas, por lo que los tratamientos aerobios son adecuados cuando los clorofenoles son completamente oxidados.

Los clorofenoles han sido ampliamente tratados mediante tecnologías aerobias de alto rendimiento utilizando procariotas, siendo la tecnología SBR una de las más estudiadas. Se han tratado mediante esta tecnología monoclorofenoles (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004; Martín-Hernández et al., 2009; Monsalvo et al., 2009), diclorofenoles (Quan et al., 2003; Sahnikaya y Dilek, 2006; Wang et al., 2007b) y PCP (Lan et al., 2005; Liu et al., 2008). En general, los rendimientos alcanzados son elevados (>90%), aunque las concentraciones en el interior del reactor no deben superar valores en torno a 0,1-0,2 g L⁻¹ para los monoclorofenoles (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004; Monsalvo et al., 2009) o 0,05 g L⁻¹ para el PCP (Liu et al., 2008) debido a problemas de toxicidad e inhibición. Por ello, para tratar

concentraciones elevadas de estos compuestos, a menudo se debe optar por t_{HR} superiores a 10 d, con el consiguiente gasto proporcional que conllevaría el escalado a plantas industriales

Una de las alternativas para la mejora de estas tecnologías es la incorporación de membranas en el interior del reactor que permitan aumentar la carga de clorofenol debido al incremento en la concentración de biomasa. Se ha modificado con relativo éxito reactores SBR al incorporar membranas en el tratamiento de 4CP, aumentando la capacidad del reactor en un 50% (Vargas et al., 2008), aunque se han detectado problemas en la evacuación del efluente a través de las membranas provocado por fenómenos de taponamiento o *fouling* (Shin y Kang, 2003). Los reactores MBR se han empleado con éxito en el tratamiento de 2CP (Carucci et al., 2007), 24DCP (Thuy y Visvanathan, 2006) y PCP (Visvanathan et al., 2005). También es posible mejorar la eficiencia de los reactores SBR añadiendo soportes inertes que permitan la formación de biopelículas (Moussavi et al., 2009).

Los reactores aerobios de lecho fluidizado también han sido efectivos en el tratamiento de clorofenoles. Por ejemplo, el tratamiento de PCP como única fuente de carbono y energía ha sido estudiado con eficiencias >99% para velocidades de carga de 0,12 g PCP L⁻¹ d⁻¹ (Melin et al., 1997). Otro estudio consideró el tratamiento de PCP presente en aguas subterráneas en concentraciones inferiores a 0,001 g L⁻¹ (Schmidt et al., 1999).

También se han empleado con éxito otras tecnologías aerobias de alta eficiencia, como los reactores tipo *air-lift loop* en la degradación de 246TCP, 2346TeCP y PCP (Langwaldt et al., 1998) o los reactores aerobios de lecho fijo para el tratamiento de una mezcla de 2CP, 4CP, 24DCP y 246TCP (Zilouei et al., 2006).

En todos los casos anteriormente citados sobre tecnologías aerobias la estrategia para maximizar el crecimiento de los microorganismos y la biodegradación de los clorofenoles se basa en la **bioestimulación** o búsqueda de las condiciones óptimas de tratamiento. Otra posible estrategia es la **bioaumentación**, consistente en la adición en el lodo de un determinado grupo de microorganismos, normalmente una especie concreta, de conocida efectividad. La especie *Pseudomonas putida* se ha utilizado para mejorar la eficiencia de un lodo floculento en un reactor de mezcla completa, verificando que la mejoría del reactor fue debida a la bioaumentación (McLaughlin et al., 2006). Asimismo, se ha utilizado para la bioaumentación de un cultivo mixto en un reactor de mezcla completa que

trataba 2CP, concluyendo que la cepa introducida funcionaba mejor si se le añadía mayor concentración de cultivo mixto, lo que sugiere la existencia de relaciones sintróficas (Farrel y Quilty, 2002). También se han empleado **consorcios enriquecidos** para la degradación de 24DCP, bioaumentando un lodo activo floculento en un reactor de mezcla completa, con eficacia únicamente durante los primeros días del proceso, probablemente debido a una ineficaz competencia de los microorganismos presentes en el consorcio (Quan et al., 2004). Por ello, en determinados casos la bioestimulación es preferible a la bioaumentación.

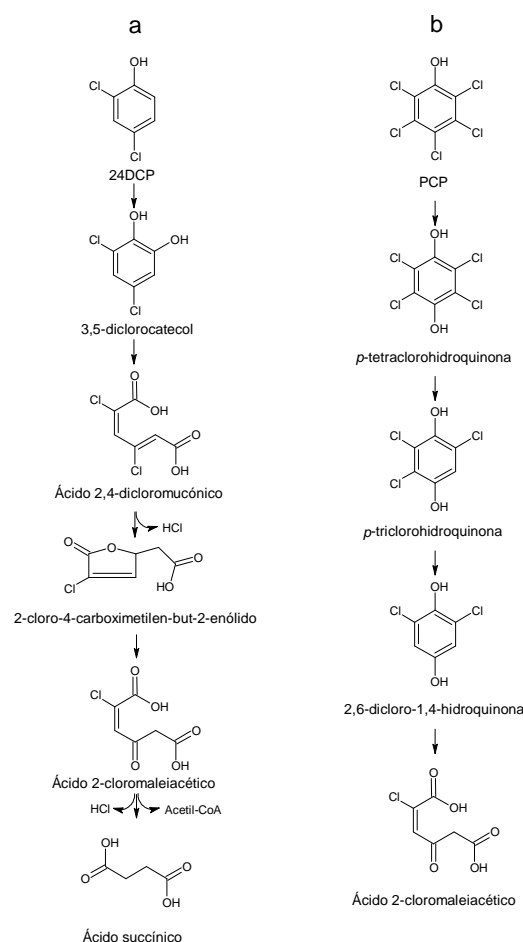


Figura 1.6: Transformaciones aeróbicas de clorofenoles por la vía de los catecoles (a, Finkel'shtein et al., 2000) y por la vía de las clorohidroquinonas (b, Steiert y Crawford, 1986).

1.3 Tratamiento anaerobio de aguas residuales industriales y aplicación en la eliminación de clorofenoles

1.3.1 Digestión anaerobia

La **digestión anaerobia** es un proceso microbiológico que tiene lugar en ambientes carentes de oxígeno y a potenciales de reducción menores de -200 mV. En estas condiciones la materia orgánica es transformada, por la acción combinada de microorganismos, en metano y dióxido de carbono. Este proceso ocurre tanto en medios naturales (sedimentos acuáticos, sistema gastrointestinal, fuentes termales) como en sistemas artificiales (reactores anaerobios).

En un proceso completo de degradación de materia orgánica en condiciones de anaerobiosis se pueden identificar cinco etapas clave en función de las reacciones mediadas por grupos específicos de microorganismos (Bermúdez et al., 1988). Este proceso se representa en la Figura 1.7:

- 1) **Hidrólisis** de polímeros orgánicos a monómeros tales como monosacáridos, ácidos orgánicos y aminoácidos.
- 2) Fermentación de aminoácidos y monosacáridos y β -oxidación de ácidos grasos superiores a hidrógeno, bicarbonato y ácidos acético, propiónico y butírico, así como a otros productos orgánicos como alcoholes y ácido láctico (**acidogénesis**).
- 3) Oxidación de productos orgánicos reducidos a acetato, hidrógeno y bicarbonato por la acción de las bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (**hidrogenoacetogénesis**).
- 4) **Metanogénesis acetoclástica** (acetotrófica).
- 5) **Metanogénesis de bicarbonato** (hidrogenotrófica).

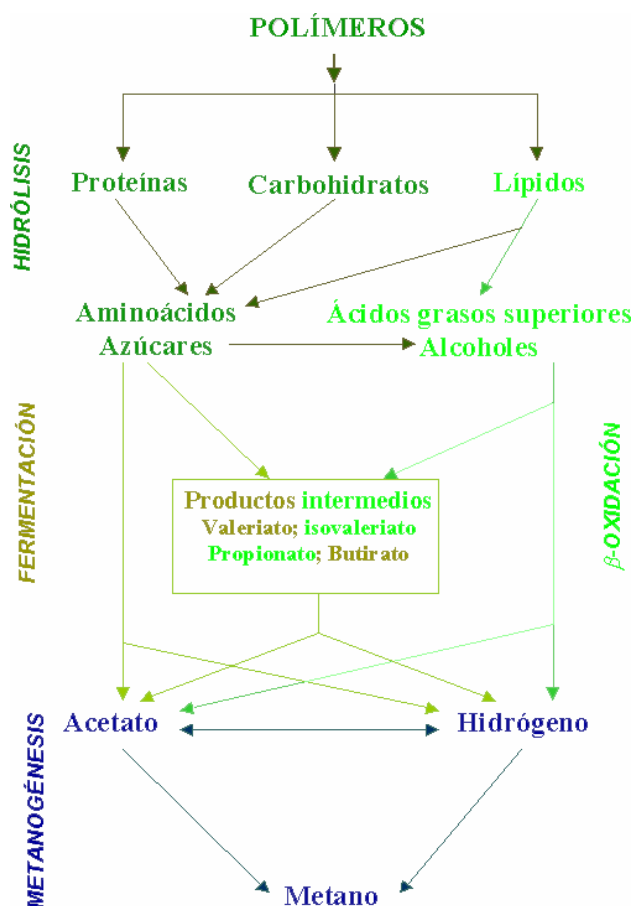


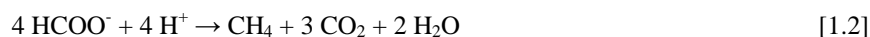
Figura 1.7: Esquema de los procesos de oxidación-reducción en la conversión microbiana de materia orgánica a metano (modificado a partir de [Stronach et al., 1986](#)).

1.3.2 La metanogénesis

La metanogénesis está considerada la etapa más importante del tratamiento anaerobio, debido a tres razones: a) En ausencia de grandes cantidades de sulfato y nitrato, es la única etapa que lleva a cabo la mineralización final de la materia orgánica (y reducción de la DQO); b) Es la única etapa que puede rentabilizarse económicamente a través de la producción de energía derivada de la combustión del metano; y c) los organismos metanógenos son los más sensibles y propensos a la inhibición cuando las condiciones del

medio son desfavorables. Los organismos metanógenos pertenecen al dominio *Archaea*. Dentro de este dominio, los metanógenos están incluidos en el phylum *Euryarchaeota*. Se dividen en cinco órdenes: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, y *Methanopyrales*. Los metanógenos pueden producir metano a partir de varios sustratos: dióxido de carbono e hidrógeno molecular, acetato y compuestos monocarbonados como ácido fórmico, metanol, metiltioles y metilaminas, en un proceso energéticamente favorable. La mayoría de los metanógenos pueden utilizar el dióxido de carbono y el hidrógeno como sustrato para la metanogénesis, comúnmente denominada **metanogénesis hidrogenotrófica**. En cualquier caso, los metanógenos que pueden utilizar el acetato (**metanogénesis acetoclástica**) y/o las metilaminas (**metil-metanogénesis**) se recogen únicamente dentro del orden *Methanosarcinales* (Shima et al., 2002).

La reducción de CO_2 a CH_4 es realizada con los electrones derivados de la oxidación bien de H_2 bien de formiato, tal y como se resume en las Ecuaciones 1.1 y 1.2 (Ferry, 1999).



La producción de metano en reactores anaerobios proviene en un 65-70% de la degradación de acetato. A pesar de ello, la metanogénesis de CO_2 e H_2 juega un papel fundamental debido a que permite mantener la presión de H_2 muy baja y con ello promover el crecimiento de bacterias que llevan a cabo la oxidación anaerobia de ácidos grasos. Las bacterias metanogénicas son extremadamente sensibles a la temperatura (con un óptimo en 35 °C), a la carga orgánica y a fluctuaciones en el pH (sólo son funcionales a pH comprendidos entre 6,5 y 8), y son inhibidas por un gran número de compuestos (Gavala et al., 2003).

1.3.3 Tecnologías anaerobias de alta eficiencia

La degradación de aguas residuales industriales mediante digestores anaerobios convencionales ha quedado obsoleta debido a la baja eficiencia habitualmente obtenida, a problemas difusionales y a la sensibilidad de este tipo de configuraciones en el tratamiento aguas que contienen compuestos tóxicos o recalcitrantes. Por eso, desde principios de los años

80 se ha investigado en tecnologías más complejas de manera que se puedan rentabilizar las ventajas que conlleva utilizar los procesos anaerobios (Speece, 1996):

- Son tecnologías económicamente muy rentables debido a la posibilidad de cogeneración de energía a partir de la combustión de los gases generados (principalmente metano) a una relación aproximada de 3000 kcal kg⁻¹ DQO consumida, a la ausencia de aporte de oxígeno al proceso (que reduce los costes en un orden de magnitud), al reducido aporte de nutrientes requerido (entre el 5-20% de los nutrientes requeridos en procesos aerobios) y a que generan menor cantidad de lodo.
- Se requiere un volumen de reacción muy inferior, debido a que soportan VCO significativamente superiores y la concentración de microorganismos en el tanque es entre 2-10 veces mayor que en reactores aerobios de fangos activos.
- La biomasa anaerobia puede mantenerse en ausencia de materia orgánica durante meses sin sufrir un deterioro importante en su actividad, lo que hace que estas tecnologías puedan utilizarse para caudales discontinuos de industrias estacionales.

Las tecnologías anaerobias de alta eficiencia se pueden dividir en cuatro tipos: tecnologías anaerobias en régimen discontinuo, tecnologías que operan con lecho fijo, con lecho móvil (soportes particulados suspendidos) y las que trabajan con asociaciones de microorganismos, conocidas como biogránulos. Éstas últimas se derivan de los reactores de manto de lodos y flujo ascendente (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*, **UASB**). En la Figura 1.8 se representa la conformación esquemática de las principales tecnologías anaerobias de alta eficiencia.

- 1) Los reactores discontinuos secuenciales anaerobios (*Anaerobic Sequencing Batch Reactor*, **ASBR**, Figura 1.8.1) operan de igual forma que los SBR aerobios. Se han utilizado tanto para el tratamiento de aguas residuales industriales (Zaiat et al., 2001; Ruiz et al., 2002; Oliveira et al., 2008) como para la eliminación de compuestos tóxicos (Pereira y Zaiat, 2009).
- 2) Las tecnologías que utilizan soportes fijos en los que se adhieren los microorganismos (*Fixed-film Bioreactor*, **FFBR**, Figura 1.8.2) son probablemente

las primeras en aparecer ([Switzenbaum, 1983](#)). Su régimen de funcionamiento es similar a los filtros de arena, por lo que las desventajas principales son el gasto necesario para bombear el agua en flujo ascendente, el riesgo de obturación de las conducciones y la aparición de flujos preferenciales si el caudal no es el adecuado. Como soportes, los más extendidos son la arena ([Sánchez et al., 1995](#)) y diferentes tipos de plásticos ([Amorim et al., 2005](#)).

- 3) Con la movilización del lecho se resuelven parte de los problemas planteados en los reactores de lecho fijo, aunque el gasto necesario para la movilización ha hecho frenar el desarrollo de estas tecnologías. Se basan en el crecimiento de biopelículas sobre los soportes y la recirculación externa del efluente que permite la expansión del lecho. Cuando el lecho se expande entre 10-20%, el reactor se denomina lecho expandido (*Expanded-bed Biofilm Reactor*, **EBBR**, Figura 1.8.3), mientras que si lo hace entre 20-100%, el resultado es el reactor de lecho fluidizado (*Fluidized-bed Biofilm Reactor*, **FBBR**, Figura 1.8.4). Estos reactores permiten trabajar con cargas muy elevadas ([Sowmeyan y Swaminathan, 2008a, 2008b](#); [Zhang et al., 2009b](#)), y se han utilizado para el tratamiento de aguas con altos contenidos en sólidos ([Moteleb et al., 2002](#); [Seok, 2003](#)). Si el soporte utilizado tiene elevada capacidad de adsorción pueden llegar a tratar elevadas cargas de tóxicos ([Khodadoust et al., 1997](#); [Koran et al., 2001](#); [Lao, 2002](#)).
- 4) El funcionamiento de los reactores **UASB** (Figura 1.8.5) es muy similar a los reactores de lecho móvil, aunque no necesitan soportes debido a la generación de biogránulos. Una modificación de este tipo de reactores ha originado los denominados reactores de manto de lodos expandido (*Expanded Granular Sludge Bed*, **EGSB**, Figura 1.8.6), en los que se aplica una recirculación externa del efluente para expandir el manto de lodos, y los reactores de recirculación interna (*Internal Circulation*, **IC**, Figura 1.8.7), que están provistos de colectores internos que recirculan los gases generados optimizando la mezcla sin necesidad de bombeo.

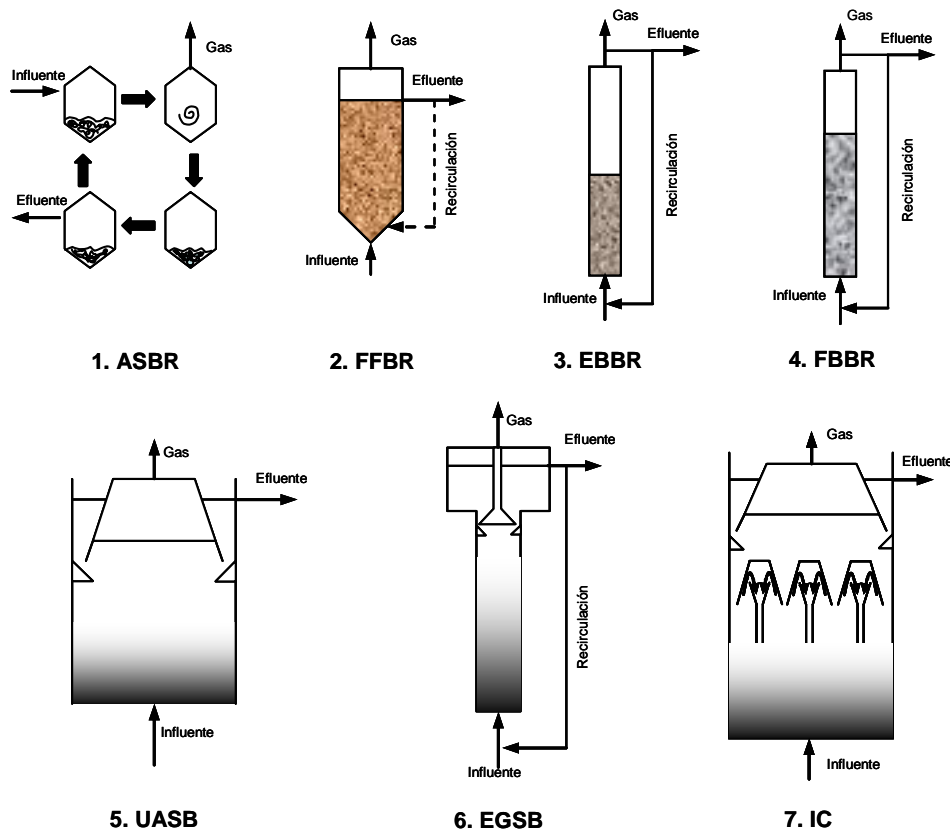


Figura 1.7: Principales tecnologías anaerobias de alta eficiencia. (1) Reactor discontinuo secuencial anaerobio. (2) Reactor anaerobio de lecho fijo. (3) Reactor anaerobio de lecho expandido. (4) Reactor anaerobio de lecho fluidizado. (5) Reactor anaerobio de manto de lodos y flujo ascendente. (6) Reactor anaerobio de manto de lodos expandido. (7) Reactor anaerobio de recirculación interna.

Los estudios sobre el tratamiento de aguas residuales industriales empleando estas tecnologías han crecido de manera exponencial desde principios de los años 90 (Figura 1.9), aunque comenzaron a desarrollarse a mediados de los años 70 (FFBR) y principios de los 80 (UASB y FBBR). Los reactores tipo UASB son actualmente los más extendidos en todo el mundo, y se calcula que abarcan en torno al 50% de los reactores a escala industrial instalados (Speece, 1996). De igual forma, es la tecnología anaerobia más estudiada, ya que ostenta en la actualidad el liderazgo en número de artículos publicados.

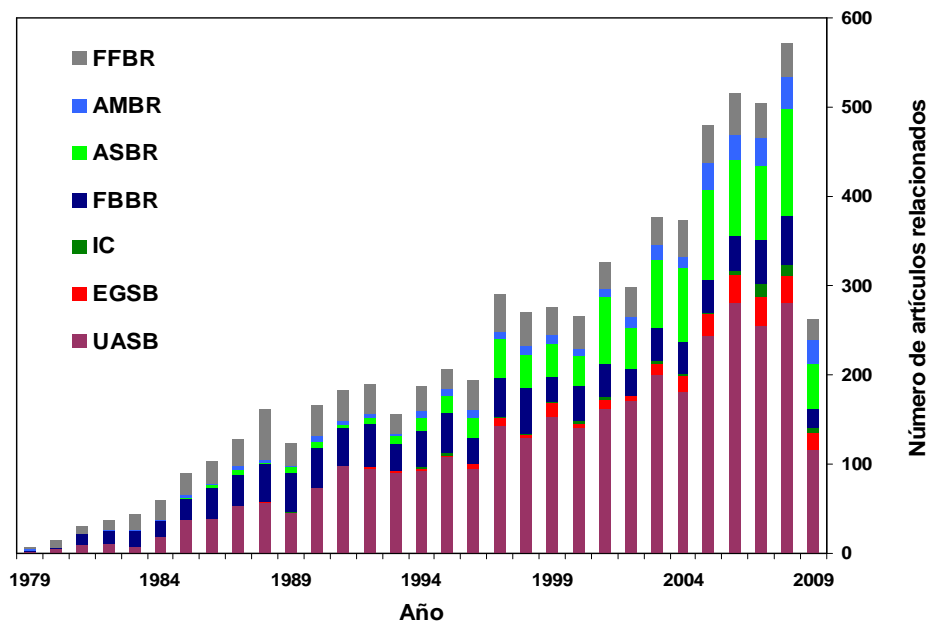


Figura 1.9: Evolución de la investigación de las tecnologías anaerobias de alta eficiencia.

Fuente: (a) Scifinder Scholar[®].

1.3.4 La tecnología UASB

Los reactores UASB tienen su origen en los descubrimientos del Prof. Gazte Lettinga a finales de los años 70 sobre la granulación de microorganismos en reactores anaerobios de lecho fijo, conocidos como clarigestores. Estos reactores sirvieron de modelo para el desarrollo de la tecnología UASB (Lettinga et al., 1980).

La base teórica de la tecnología UASB se fundamenta en la agregación de los microorganismos anaerobios en densos y compactos gránulos que hacen innecesaria la utilización de soportes para el crecimiento de los microorganismos. Estos gránulos presentan tamaños que oscilan entre 0,5-2 mm y están compuestos en su mayoría por microorganismos, aunque la materia inorgánica parece ser fundamental en las etapas previas de su formación (Liu et al., 2003). Existen muchas teorías acerca de los mecanismos de **granulación** (Hulshoff et al., 2004). Díaz (2002) sugiere que, inicialmente, debido al flujo ascendente en los

reactores, los microorganismos chocan entre sí y con partículas inorgánicas, generando proto-núcleos, los cuales comienzan a crecer por división celular y por la adhesión de otros microorganismos, dando lugar a proto-gránulos. En la superficie de ellos se desarrollan bacterias facultativas que eliminan las trazas de oxígeno disuelto antes de entrar en contacto con los metanógenos, que se ubican formando grandes colonias en el interior del gránulo. Tras el periodo de maduración, comienzan a aparecer huecos y canales, que finalmente conducen a la disgregación del gránulo. Cada fragmento, debido a su actividad, funcionará como un nuevo proto-núcleo, por lo que el sistema estará en continua formación, manteniendo en todo momento la proporción de gránulos (los mas abundantes), gránulos maduros, proto-gránulos, proto-núcleos y, en menor medida, microorganismos dispersos (Díaz, 2002). Un esquema de este proceso se recoge en la Figura 1.10.

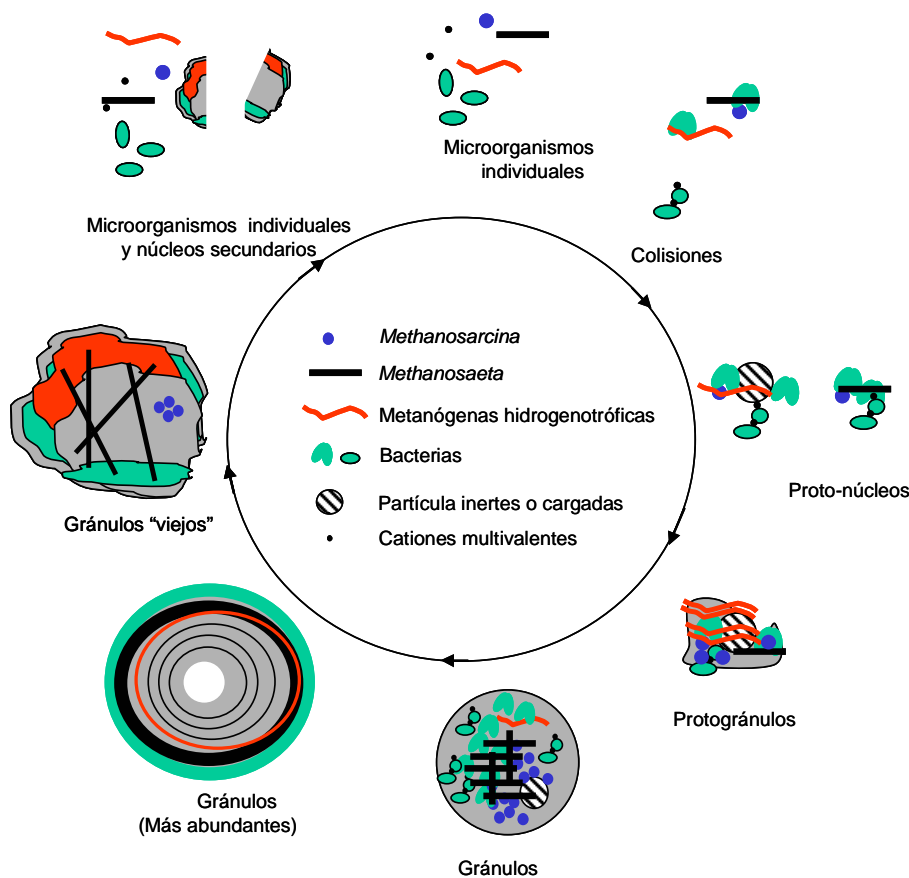


Figura 1.10: Fases del proceso de granulación (Díaz, 2002).

La formación de los gránulos no sería posible sin la selección de los tamaños más grandes por el caudal ascendente. Según la **teoría de la presión selectiva** (Hulshoff et al., 1988), el lavado de los microorganismos es la etapa crucial del proceso, ya que facilita el crecimiento de los pellets retenidos (los más pesados). A este respecto, la presencia de partículas inertes que sirven como superficie de adhesión es claramente ventajosa.

Los reactores UASB comparten todas las ventajas de las tecnologías anaerobias de alta eficiencia pero, debido al proceso de granulación, además:

- Soportan grandes cargas de tóxicos, ya que los metanógenos se encuentran en el interior de los gránulos, por lo que están menos expuestos a ellos.
- Pueden trabajar con pequeñas concentraciones de oxígeno disuelto (condiciones aerobias limitantes), debido a que en la superficie de los gránulos a menudo crecen bacterias facultativas (Gardin et al., 2001).
- Admiten mayores caudales que los reactores anaerobios convencionales sin perder biomasa, ya que la densidad de los gránulos hace que la velocidad de sedimentación sea mucho mayor que la de los típicos flóculos.
- Pueden tratar elevadas VCO debido a que la concentración de biomasa es muy elevada (oscilando en torno a 20 g SSV L⁻¹, 10 veces mayor que en un reactor aerobio de mezcla completa).
- Al tratarse de columnas tubulares, se ahorra gran cantidad de espacio.
- Se maximiza la producción de metano debido a la mejora del contacto entre el agua y los microorganismos.

En 1998 se habían registrado en el mundo al menos 1200 plantas a escala industrial para el tratamiento de efluentes industriales (en la actualidad se estima que hay unas 3000). El abanico de usos de esta tecnología es muy amplio, ya que el tratamiento anaerobio de aguas residuales no se limita únicamente a la degradación de contaminación orgánica (Seghezzo et al., 1998). Hoy en día, es muy habitual la combinación de las tecnologías basadas en los reactores UASB con otras tecnologías, dando como resultado reactores híbridos que reúnen

las ventajas de ambas. A continuación se presenta una descripción del empleo de estas tecnologías para el tratamiento de aguas residuales industriales.

1.3.4.1 Tratamiento de aguas residuales industriales heterogéneas

Un tipo de aguas residuales industriales tradicionalmente tratadas por esta clase de tecnologías son las producidas por la **industria alimentaria**, debido principalmente a la elevada carga orgánica y los altos contenidos en SSV. A este respecto, la tecnología UASB ha sido utilizada recientemente en el tratamiento de aguas residuales de matadero (Ruiz et al., 1997; Manjunath et al., 2000; Caixeta et al., 2002; Torkian et al., 2003), industria láctea (Nadais et al., 2005; Coelho et al., 2007; Tawfik et al., 2008; García et al., 2008), cervecera (Cronin et al., 1998; Ahn et al., 2001; Rao et al., 2007), producción de café (Bello-Mendoza y Castillo-Rivera, 1998), helados (Hu et al., 2008), aceite (Aangelidaki et al., 2002; Azbar et al., 2009; El-Gohary et al., 2009), industrias de bollería y panadería (Radrigan et al., 2002), industrias vinícolas (Chamy et al., 2007) y pesqueras (Puñal y Lema, 1999; Palenzuela-Rollon et al., 2002), entre otras.

Las aguas residuales de la **industria papelera** se caracterizan por una elevada DQO, debido a la celulosa, y por contener altas concentraciones de resinas ácidas tóxicas y compuestos orgánicos clorados, procedentes del blanqueo de la pulpa de papel. Son por ello difíciles de tratar en reactores biológicos convencionales. En cambio, han sido profusamente tratadas mediante tecnologías basadas en los reactores UASB (Kim et al., 2003; Mahadevaswamy et al., 2004; Chinnaraj y Venkoba Rao, 2006).

Otros tipos de industrias en los que la tecnología UASB ha sido un agente activo en la depuración de sus aguas residuales son la industria **petroquímica** (Stergar et al., 2003), **farmacéutica** (Zheng y Hu, 2002; Oktem et al., 2008; Sreekanth et al., 2009), **textil** (Gomes et al., 2007; Somasiri et al., 2008), de **curtidos** (Rajesh Banu y Kaliappan, 2007; Suthanthararajan et al., 2007) y del **procesado de madera** (Vidal y Díez, 2005), entre otras.

1.3.4.2 Tratamiento de compuestos inorgánicos

La **bioacumulación** de metales pesados apenas ha sido estudiada debido a la inevitable toxicidad que tienen sobre los microorganismos anaerobios, especialmente los metanógenos (Lin y Chen, 1999), a pesar que se conoce que muchos de aquellos son capaces de reducir Fe^{3+} u oxidar As^{3+} (Teer et al., 1997; Drewniak et al., 2008; Sun et al., 2009). Además, los procesos de sulfatorreducción permiten eliminar metales pesados de efluentes industriales al precipitarlos en forma de sulfuros. La puesta en práctica de estos conocimientos en tecnologías funcionales es hoy en día un reto, lográndose hasta ahora progresos relacionados con fenómenos de adsorción (Hawari y Mulligan, 2006, 2007).

Compuestos inorgánicos de S y N han sido eliminados biológicamente desde hace décadas, pero hasta hace relativamente poco tiempo no existían tecnologías que eliminasen estos compuestos en ausencia de dadores de electrones orgánicos. Con el descubrimiento de la **desnitrificación autotrófica** se han utilizado reactores tipo UASB para este propósito (Fernández et al., 2008a, 2008b, 2009; Sánchez et al., 2008).

1.3.4.3 Tratamiento de compuestos orgánicos alifáticos

Dentro de este tipo de compuestos, los **hidrocarburos clorados alifáticos** (CAH) representan un grupo mayoritario. El tetracloroetileno (PCE) es un compuesto cancerígeno y peligroso para el medioambiente que se utiliza como disolvente de textiles y metales. Prakash y Gupta (2000) consiguieron biodegradar hasta un 98,5% de PCE en un amplio intervalo de concentraciones ($5\text{--}50\text{ mg L}^{-1}$). El tricloroetileno (TCE) también ha sido biodegradado mediante reactores UASB (Sponza 2001, 2002). Se han tratado además alcanos policlorados, como el 1,1,1,2-tetracloroetano, en condiciones metanogénicas, alcanzando una velocidad máxima de degradación de $280\text{ }\mu\text{mol g}^{-1}\text{ SSV d}^{-1}$ (Culubret et al., 2001). Sanz et al. (1997) estudiaron el efecto inhibitorio de algunos de estos compuestos sobre la actividad metanogénica acetoclástica en un lodo granular procedente de un reactor UASB, encontrándose que la toxicidad de éstos compuestos es reversible, y Rodríguez y Sanz (1998) mostraron la posibilidad de aclimatación del lodo anaerobio a este tipo de compuestos en

ensayos realizados en discontinuo. El tetracloruro de carbono, o tetraclorometano, es otro de los compuestos alifáticos tratado mediante reactores UASB (Sponza, 2003).

Respecto a los detergentes y surfactantes, hay que destacar el tratamiento del **sulfonato alquilbencénico lineal** (LAS), por ser el surfactante más extendido en el mundo. Sanz et al. (2003) trataron este compuesto con reactores UASB, logrando una eficacia entre 64-85% de degradación con cargas de 4-5 mg LAS L⁻¹ d⁻¹, siendo mayor en ausencia de cosustratos carbonosos.

Los **tintes** también están incluidos dentro del amplio abanico de compuestos tratables por las tecnologías UASB. Se ha estudiado la degradación de RR2 en condiciones termofílicas mediante reactores EGSB (dos Santos et al., 2003), la degradación anaerobia de Acid Orange 7 (Méndez-Paz et al., 2005a, 2005b) e incluso la degradación conjunta de varios tintes (Brás et al., 2005). Todos estos estudios tuvieron en común una elevada tasa de decoloración.

1.3.4.4 Tratamiento de compuestos orgánicos aromáticos

Se engloban bajo esta denominación todos los compuestos orgánicos cuyo esqueleto está compuesto por uno o varios anillos bencénicos. El tratamiento de **benceno** en reactores UASB se ha estudiado bajo condiciones desnitrificantes con resultados prometedores debido a la eliminación conjunta de tolueno, nitrato y acetato, y a su transformación en N₂ y CO₂ con una producción mínima de lodo (Martínez et al., 2007). La degradación de otros compuestos englobados como BTEX (Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) ha sido estudiada en las mismas condiciones (Dou et al., 2008a, 2008b), por lo que no sería extraña la aplicabilidad de reactores UASB para su eliminación.

El 2,4-dinitrotolueno (24DNT), precursor en la fabricación de trinitrotolueno (TNT), suele aparecer en suelos contaminados por explosivos y en aguas residuales de industrias de fabricación de propelentes y plastificantes. Es un compuesto muy tóxico y cancerígeno que ha sido satisfactoriamente tratado mediante reactores UASB (Sponza y Atalay, 2003).

Los **compuestos fenólicos** y sus derivados son el grupo de contaminantes orgánicos más extensamente tratados por tecnologías UASB: fenol (Veeresh et al., 2005), catecol

(Subramanyam y Mishra, 2007) o nitrofenoles (Kuscu y Sponza, 2009). También se ha intentado biodegradar compuestos muy recalcitrantes como los bifenilos policlorados (PCBs) con tecnologías UASB, con poco éxito hasta el momento debido a que se consigue declorar los anillos, pero sin llegar a romperlos (Nollet y Verstraete, 2003).

Debido a requerimientos legales cada vez más estrictos y al desarrollo de técnicas analíticas más precisas se hace necesario eliminar compuestos presentes en aguas residuales en bajas concentraciones, como pesticidas, productos de cuidado personal y fármacos. Entre los pesticidas, los del tipo ciclodiénico, como el aldrín, isodrin, endrin y dieldrin, actualmente en desuso, han sido satisfactoriamente tratados anaeróbicamente con lodo granular procedente de reactores UASB (Baczynski et al., 2004). Uno de los herbicidas más utilizados, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (24D), también ha podido ser declorado anaeróbicamente hasta una concentración de 100 mg L⁻¹ (Berestovskaia et al., 2000).

1.3.5 Biodegradación de clorofenoles en condiciones anaerobias

En condiciones anaerobias, la degradación de los clorofenoles es más compleja que en condiciones aerobias debido al mayor número de vías metabólicas empleados por los microorganismos. En general, los microorganismos anaerobios sólo son capaces de obtener energía y fuente de carbono a partir de los monoclorofenoles. En todos los demás casos, los microorganismos necesitan del aporte externo de electrones para que la degradación de los clorofenoles tenga efecto, en un proceso denominado **decloración reductiva** (Field y Sierra-Álvarez, 2008). Es difícil de discernir si el proceso de decloración reductiva es **cometabólico** o los microorganismos obtienen energía de ello (**halorespiración**), ya que para ello es necesario realizar ensayos con evidencias cinéticas en condiciones controladas, siguiendo la evolución tanto la fuente de electrones (generalmente sustratos orgánicos simples), el receptor de electrones (el clorofenol estudiado) y sus productos derivados de la deshalogenación, y la concentración de biomasa (Sponza y Ulukoy, 2008). Existen además **procesos abióticos** que provocan la decloración reductiva, mediados por compuestos con carácter catalítico como los cofactores F₄₃₀, vitamina B₁₂ o hematina, presentes en ambientes metanogénicos (Zhang et al., 2009c). En estos casos los procesos son enormemente lentos, por lo que la depreciación de los mismos no supone un error elevado si la biomasa se encuentra activa (Smith y Woods, 1994).

Para facilitar la discusión en los trabajos publicados, a menudo se considera que la biomasa aclimatada a un clorofenol ha desarrollado una cantidad elevada de microorganismos capaces de realizar halo-respiración (Smidt et al., 2000; Deshmukh et al., 2009).

1.3.5.1 Conversiones abióticas. La habilidad decloradora de los cofactores.

Muchos enzimas comúnmente localizados en procariotas anaerobios contienen **cofactores metálicos de transición** en sus centros activos. Estos cofactores pueden ser Co (vitamina B₁₂), Ni (cofactor F₄₃₀) o Fe (hematina), situados en el interior de un **anillo porfirínico**. Al poder existir en varios estados de oxidación, se ha demostrado que estos **corrinoideos** son capaces de funcionar como dadores de electrones para la decloración reductiva de clorofenoles y otros compuestos orgánicos clorados (Krone et al., 1989; Smith y Woods, 1994; Morra et al., 2000; Nelkenbaum et al., 2007). Asimismo, como se verá después, estos corrinoideos juegan un papel fundamental en los procesos de decloración cometabólicos.

1.3.5.2 Clorofenoles como fuente de carbono y energía

Existen muy pocos compuestos aromáticos clorados que pueden ser utilizados por microorganismos anaerobios como fuente de carbono y energía. Un consorcio metanogénico puede utilizar el 4CP como única fuente de carbono y energía mediante la decloración reductiva del 4CP y la posterior oxidación del fenol resultante, que funcionará como dador de electrones para la siguiente decloración (Boyd y Shelton, 1984). Esto es posible debido a que la energía obtenida de la oxidación anaerobia del fenol es superior a la necesaria para la decloración reductiva del 4CP. La demostración de estos procesos ha sido llevada a cabo mediante balances de masas o radio-marcando los compuestos clorados con ¹⁴C, en la degradación anaerobia de 3CP y 4CP como únicas fuentes de carbono y energía (Krumme y Boyd, 1988). También se ha observado que existen organismos sulfatoredutores que pueden utilizar monoclorofenoles para la reducción de sulfato a sulfito o sulfuro (Hagglblom y Young, 1995). La desnitrificación puede igualmente estar asociada a la degradación de monoclorofenoles (Bae et al., 2002).

1.3.5.3 Decloración reductiva

El proceso de decloración reductiva se basa en la sustitución de un átomo de cloro de una molécula orgánica por un átomo de hidrógeno en un proceso exergónico, debido a que los potenciales redox estándar para R-Cl/R-H varían entre +250 y +600 mV. Por ello, estos compuestos son termodinámicamente favorables como aceptores de electrones en condiciones anaerobias (Holliger et al., 1998). En la mayoría de los estudios realizados resulta difícil establecer si el proceso es fortuito o si los microorganismos obtienen beneficio energético, debido a que químicamente el proceso es el mismo, y a que mayoritariamente se han utilizado consorcios anaerobios complejos en el tratamiento de clorofenoles. Los procesos cometabólicos en la degradación de clorofenoles transcurren gracias a la inespecificidad de los corrinoides (principalmente el cofactor F₄₃₀ y la vitamina B₁₂) presentes en ciertos organismos anaerobios, tales como los acetógenos o los metanógenos. En la Figura 1.11 se muestra un esquema de este proceso. Este tipo de procesos sucede habitualmente cuando se pone en contacto un consorcio anaerobio con un contaminante al que no está adaptado. Así, se ha verificado la decloración reductiva de 24DCP en sedimentos marinos no adaptados (Zhang y Wiegel, 1990). Asimismo, se ha estudiado la aclimatación de un consorcio metanogénico a la decloración reductiva de 2CP, 3CP, 4CP y PCP en discontinuo mediante adiciones sucesivas de los compuestos y el sustrato principal (sacarosa), encontrando que desde la primera adición se observó decloración reductiva de los compuestos, pero hasta la cuarta adición el aumento de la tasa de decloración no fue significativa (día 65), lo que sugiere una lenta adaptación del lodo anaerobio (Ye y Shen, 2004). Takeuchi et al., (2000) estudiaron la degradación de 19 clorofenoles con lodo no aclimatado, observando que las vías preferenciales de decloración transcurren prioritariamente a través de la decloración de las posiciones *orto*, seguido de las *meta* y finalmente las *para*. Sin embargo, Dolfing y Harrison (1992) sugirieron que los microorganismos decloran la posición con la que mayor energía obtienen en base a la diferencia de potencial redox, y en el caso de los clorofenoles el orden de potencial redox de los enlaces C-Cl es justamente el contrario, es decir, *para* > *meta* > *orto*.

La **halorespiración** (también denominada dehalorespiración o clorurogénesis) es un tipo de respiración anaerobia en la que los microorganismos utilizan los compuestos orgánicos halogenados como aceptores de electrones, conservando la energía a través de la

fosforilación acoplada al transporte de electrones (Holliger et al., 1998; Smidt y de Vos, 2004). Durante esta reacción, uno o más átomos de cloro son eliminados de la molécula orgánica y reemplazados por átomos de hidrógeno (**hidrogenolisis**) o, en el caso de compuestos alifáticos clorados, dos átomos de cloro pueden ser eliminados simultáneamente formando un enlace doble (**dicloroeliminación**) (Van Pee y Unversucht, 2003; Chen et al., 2004). Debido al elevado valor del potencial rédox de la hidrogenolisis, los microorganismos que realizan halorespiración pueden obtener entre -130 y -180 kJ mol⁻¹ de energía libre de Gibbs por átomo de cloro eliminado, lo que les permite acoplar la decloración reductiva con su crecimiento (Smidt y de Vos, 2004).

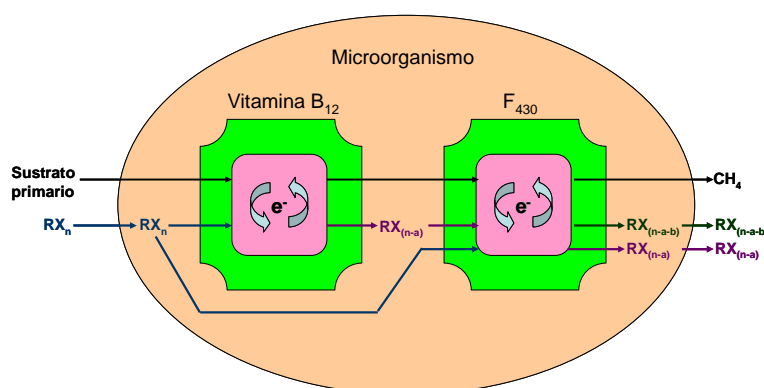


Figura 1.11: Esquema del papel de los cofactores biológicamente generados como la vitamina B₁₂ y el cofactor F₄₃₀ en la decloración reductiva cometabólica de clorofenoles (RX_n) realizada por metanógenos (adaptado de van Eekert, 1999).

La primera bacteria aislada capaz de realizar halorespiración fue *Desulfomonile tiedjei* DCB-1, en un estudio enfocado a la decloración reductiva del ácido 3-clorobenzoico (Deweerd et al., 1991). Desde entonces han ido apareciendo en la bibliografía diversas bacterias capaces de realizar este proceso. En general, se trata de organismos próximos a bacterias sulfatorreductoras, y están incluidos en los *phyla* *Proteobacteria* y *Firmicutes* (Gram-positivas con bajo contenido en G+C). La única excepción es el género *Dehalococcoides*, perteneciente al *phylum* *Chloroflexi* o bacterias verdes no del azufre. En la Figura 1.12 se muestra el árbol filogenético de las bacterias capaces de realizar halorespiración.

No todas las bacterias capaces de realizar halorespiración pueden utilizar los clorofenoles como aceptores finales de electrones. Esto es debido principalmente a impedimentos estéricos provocados por la cercanía del átomo de cloro al anillo aromático, lo que dificulta que los cofactores propios de los enzimas involucrados en el proceso (**deshalogenasas**) puedan entrar en contacto con el enlace C-Cl. Las bacterias capaces de realizar halorespiración de clorofenoles pertenecen a los géneros *Desulfitobacterium*, *Desulfovibrio*, *Anaeromixobacter* y *Desulfomonile*. En la Tabla 1.1 se muestran los tipos de aceptores clorofenólicos de estas bacterias, así como las moléculas ensayadas como dadores de electrones. Los donantes de electrones más frecuentes para este proceso son los ácidos orgánicos de 3 y 4 átomos de carbono, etanol, formiato e hidrógeno. El orden más común en la halorespiración de clorofenoles es el mismo que para cualquier decloración reductiva, es decir, *orto-meta-para* (Nicholson et al., 1992). De esta manera, se ha establecido la ruta de decloración de PCP, vía 2345TeCP, 345TCP, 34DCP y finalmente 4CP, que es declorado hasta fenol, que posteriormente se transforma en metano vía benzoato (Nicholson et al., 1992). Por otro lado, los organismos adaptados a la decloración de clorofenoles específicos desarrollan rutas similares cuando son puestos en contacto con otros clorofenoles. De esta manera, se ha demostrado que un consorcio adaptado a la degradación de PCP vía 4CP tiene la capacidad de degradar 246TCP vía *orto* hasta 4CP que, finalmente, es declorado por vía *para* hasta fenol (Kennes et al., 1996).

El proceso de halorespiración está mediado por un tipo de enzimas denominado **deshalogenasas reductivas**. Se han aislado este tipo de enzimas en bacterias del género *Desulfitobacterium* (Löffler et al., 1996; Christiansen et al., 1998; van de Pas et al., 1999, 2001; Boyer et al., 2003; Villemur et al., 2006). En general, los enzimas que median el proceso de *orto*-decloración de clorofenoles (***orto*-clorofenol deshalogenasas reductivas**, *o*-CDR) son proteínas ferrosulfuradas que contienen corrinoïdes (Christiansen et al., 1998; van de Pas et al., 1999; Boyer et al. 2003). Este hecho es especialmente significativo, ya que no se había observado con anterioridad que los corrinoïdes catalizasen reacciones bioquímicas en las que existiese transferencia de electrones, por lo que se puede considerar este proceso como un nuevo tipo de reacción bioquímica (Holliger et al., 1998). Se ha observado que estos enzimas presentan actividad muy baja en la decloración de las posiciones *meta* y *para* (Boyer et al., 2003). Recientemente se han aislado enzimas específicos que catalizan el proceso de *meta*-decloración (***meta*-clorofenol deshalogenasas reductivas**, *m*-CDR), mostrando así que

la dechloración de cada posición en los clorofenoles está mediada por enzimas diferentes. Ello provoca que, aunque el rango de bacterias capaces de realizar halo-respiración es muy extenso, cada bacteria tiene una especificidad muy alta para un número de procesos limitado. De esta manera, se ha observado que cepas de la especie *Desulfitobacterium hafniense* (DCB-2 y PCP-1, ver Tabla 1.1) actúan sobre sustratos diferentes (Bouchard et al., 1996; Christiansen y Ahring, 1996), por lo que se sugiere que el contenido enzimático también difiere.

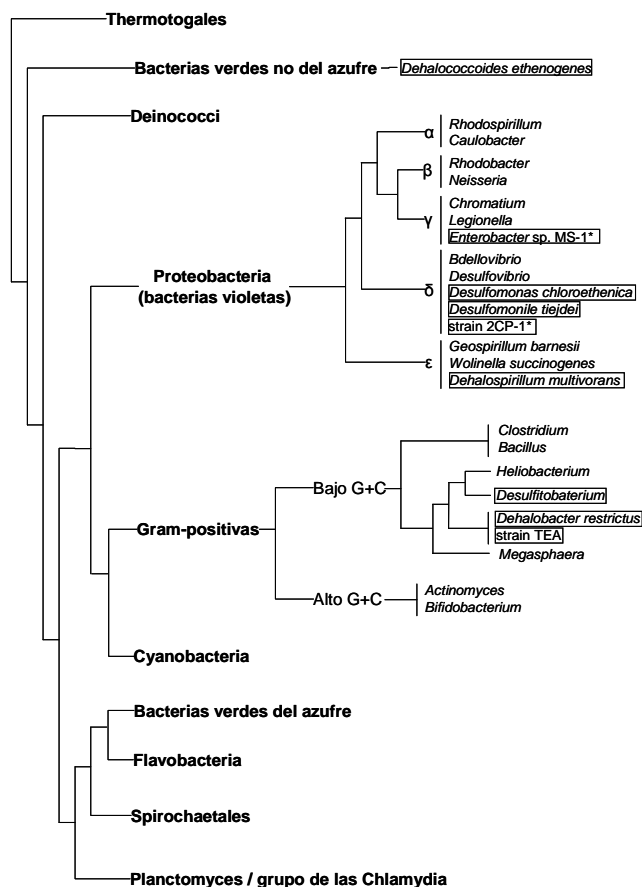


Figura 1.12: Árbol filogenético, basado en el análisis del ARNr 16S, de bacterias capaces de realizar halo-respiración (encuadradas). Los anaerobios facultativos están marcados con un asterisco (Holliger et al., 1998).

Tabla 1.1: Bacterias anaerobias capaces de realizar halo-respiración de clorofenoles (adaptado de [Field y Sierra-Álvarez, 2008](#))

Cepa	Aceptores de electrones y productos*	Dadores de electrones	Referencia
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> PCP-1	PCP → 3CP 2345TeCP → 3CP 2356TeCP → 3CP 234TCP → 34DCP 235TCP → 25DCP 236TCP → 25DCP 245TCP → 34DCP 246TCP → 4CP 345TCP → 3CP 26DCP → 2CP 24DCP → 4CP 35DCP → 3CP	Piruvato	Bouchard et al., 1996
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> TCP-A	PCP → 2345TeCP 2356TeCP → 35DCP 235TCP → 35DCP 246TCP → 24DCP 35DCP → 3CP 24DCP → 4CP 2CP → P	Lactato, piruvato, H ₂	Breitenstein et al., 2001
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	246TCP → 4CP 3C4HPA → 4HPA	Piruvato	Christiansen y Ahring, 1996
<i>Desulfitobacterium chlororespirans</i> Co23	23DCP → 3CP 26DCP → 2CP 246TCP → 2CP 3C4HPA → 4HPA 3C4HBc → 4HBc	Formiato, butirato, H ₂ , piruvato, lactato	Sanford et al., 1996
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> JW/IU-DC1	24DCP → 4CP 3C4HPA → 4HPA	Piruvato, lactato, formiato, H ₂	Utkin et al., 1994
<i>Desulfitobacterium</i> PCE-1	246TCP → 4CP 2CP → P 3C4HPA → 4HPA	Lactato, piruvato, butirato, formiato, succinato, etanol	Gerritse et al., 1996
<i>Desulfitobacterium</i> Viet 1	24DCP → 4CP	Piruvato, lactato	Tront et al., 2006
<i>Desulfovibrio dechloracetivorans</i> SF3	26DCP → P 2CP → P	Acetato, piruvato, lactato, fumarato, propionato, etanol	Sun et al., 2000
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	26DCP → P 2CP → P	Acetato, H ₂ , succinato, piruvato, formiato	He y Sanford, 2002, 2004; Sanford et al., 2002

Tabla 1.1 (Continuación)

<i>Desulfomonile tiedjei</i> DCB-1	PCP → 246TCP	Ácido 3-clorobenzoico	Mohn y Kennedy, 1992
	2346TeCP → 246TCP		
	2356TeCP → 26DCP		
	234TCP → 24DCP		
	235TCP → 2CP		
	236TCP → 26DCP		
	245TCP → 24DCP		
	23DCP → 2CP		
	25DCP → 2CP		
	34DCP → 4CP		
	35DCP → 3CP		
Cepa no identificada 2CP-1	26DCP → P	Formiato, acetato, extracto de levadura	Cole et al., 1994
	2CP → P		
Cepa no identificada DCB-2	PCP → 345TCP	Piruvato, extracto de levadura.	Madsen y Licht, 1992
	245TCP → 34DCP		
	24DCP → 4CP		
	35DCP → 3CP		

* 3C4HPA: ácido 3-cloro-4-hidroxifenilactético; 4HPA: ácido 4-hidroxifenilactético; 3C4HBC: ácido 3-cloro-4-hidroxibenzoico; 4HBC: ácido hidroxibenzoico.

El mecanismo de reacción que permite la halorespiración catalizada por deshalogenasas reductivas todavía no está completamente establecido. Existen evidencias experimentales que suponen la existencia de dos modelos que describen la posible participación de los cofactores del tipo corrinoide en la transferencia de electrones desde proteínas de membrana de la cadena transportadora de electrones hasta los compuestos orgánicos halogenados (Neumann et al., 1996; Schumacher et al., 1997). Un modelo sugiere la **formación de un inductor organocobáltico**, de igual modo que en las metiltransferasas (Figura 1.13a). De acuerdo con el segundo modelo, la reacción está **mediada por un radical intermedio** (Figura 1.13b), como se ha descrito en deshalogenasas reductivas dependientes del corrinoide B₁₂ (Banerjee et al., 2003).

1.3.5.4 El género *Desulfitobacterium*

El género *Desulfitobacterium* está representado por bacterias anaerobias estrictas que pertenecen a los taxones *Firmicutes*, *Clostridia*, *Clostridiales* y *Peptococcaceae*. Han sido aisladas inicialmente de ambientes contaminados con compuestos orgánicos

halogenados. Son microorganismos muy versátiles que pueden utilizar una amplia variedad de aceptores de electrones, tales como nitrato, sulfito, metales, ácidos húmicos y compuestos orgánicos halogenados tanto sintéticos como naturales. La mayoría de las cepas *Desulfitobacterium* pueden deshalogenar compuestos orgánicos halogenados a través de mecanismos de deshalogenación reductiva, aunque el espectro de compuestos orgánicos halogenados varía sustancialmente entre una cepa y otra, incluso entre cepas que pertenecen a la misma especie (Villemur et al., 2006).

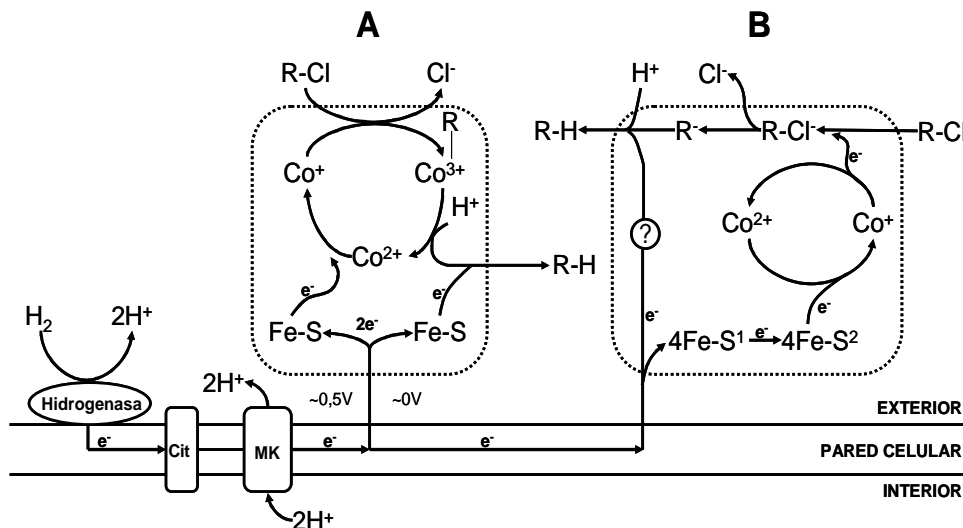


Figura 1.13: Mecanismos de reacción propuestos de las deshalogenasas reductivas (a partir de Middeldorp et al., 1999). (A) Formación de hidrocarburo halogenado intermediario. (B) Formación de radical. Abreviaturas: Cit: citocromo; MK: menaquinona.

La primera cepa del género (*D. hafniense* DCB-2) fue aislada en 1992 (Madsen y Licht, 1992), aunque el género no fue reconocido hasta 1994 tras el aislamiento de la cepa *D. dehalogenans* (Utkin et al., 1994). Desde entonces, se han aislado hasta 9 especies diferentes, siendo la especie *D. hafniense* la más estudiada, con el aislamiento de hasta 9 cepas. En la Figura 1.14 se muestra el árbol filogenético del género y su relación con los táxones filogenéticamente más cercanos. Al igual que la mayoría de microorganismos que realizan halorespiración, el género *Desulfitobacterium* es capaz de sintetizar deshalogenasas reductivas. La particularidad es que, hasta el momento, la única especie aislada capaz de

realizar halo-respiración en la posición *para* de los clorofenoles es la cepa *D. hafniense* PCP-1, característica demostrada en la biodegradación de PCP hasta 3CP (Bouchard et al., 1996). Ello permite suponer que este género es capaz de sintetizar deshalogenasas reductivas que propician la decloración en esta posición, aunque aún no se han logrado aislar e identificar.

Desde el primer momento, se ha aprovechado las características halo-respirativas del género para la biodegradación anaerobia de clorofenoles. En la Figura 1.15 se muestra al amplio abanico de compuestos que son capaces de declorar, así como el producto resultante de la decloración. Debido a la capacidad de declorar en todas las posiciones del anillo fenólico, cabe suponer que exista un número de cepas suficiente para abarcar todas las posibles combinaciones de clorofenoles, lo que confiere a este género una aplicabilidad única que no posee ningún otro taxon.

Se han aislado cepas *Desulfitobacterium* de entornos anaerobios en los que se detectó decloración de clorofenoles. Así, la cepa *D. hafniense* TCP-A se aisló a partir de sedimentos de río que eran capaces de crecer y declorar el 246TCP hasta 4CP (Breitstein et al., 2001). Por su parte, *D. chlororespirans* ha sido aislada a partir de suelos compostados contaminados con 23DCP (Sanford et al., 1996), mientras que la cepa *D. hafniense* PCP-1 se aisló a partir de una mezcla de muestras de suelo contaminadas con PCP y lodo anaerobio metanogénico procedente de un reactor UASB que trataba PCP (Bouchard et al., 1996). Estas cepas se han utilizado para bioaumentar reactores anaerobios de alta eficiencia para el tratamiento de clorofenoles. Empleando un reactor UASB con la cepa *D. hafniense* PCP-1 para el tratamiento de PCP se ha observado mediante seguimiento por PCR competitiva la eficiencia de la bioaumentación. La cepa pareció competir bien con el resto de microorganismos del consorcio con un aumento de la población de 4 órdenes de magnitud en 70 d. El reactor UASB logró una eficiencia del 99% con velocidades de carga de PCP de hasta 80 mg L⁻¹ d⁻¹, siendo el 3CP y el fenol los principales intermedios de degradación detectados (Tartakovsky et al., 1999). En un trabajo complementario a éste, se describió la microestructura de los gránulos anaerobios bioaumentados con la cepa *D. hafniense* PCP-1. La colonización de los gránulos por esta bacteria se estudió mediante FISH, encontrando que se situaban principalmente en las capas externas, por lo que podían servir de protección a los microorganismos interiores (metanógenos principalmente), disminuyendo así el efecto tóxico del PCP (Lanthier et al., 2002).

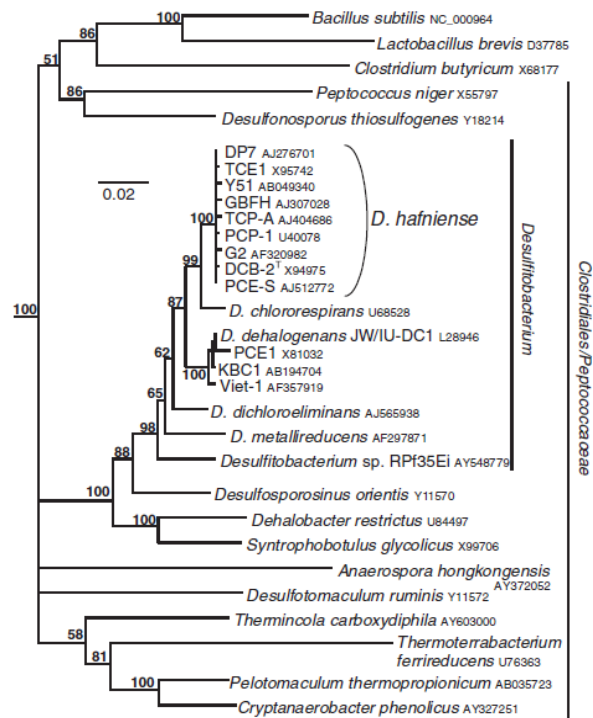


Figura 1.14: Árbol filogenético de *Desulfitobacterium* spp. basado en el gen del ARNr 16S.

Se representa las secuencias del ARNr 16S de las especies de *Desulfitobacterium* y de especies representativas de diferentes géneros pertenecientes a la familia Peptococcaceae.

Como *out-tree* se han incluido algunos géneros representativos del *phylum* Firmicutes

(*Clostridium*, *Bacillus* y *Lactobacillus*) (Villemur et al., 2006).

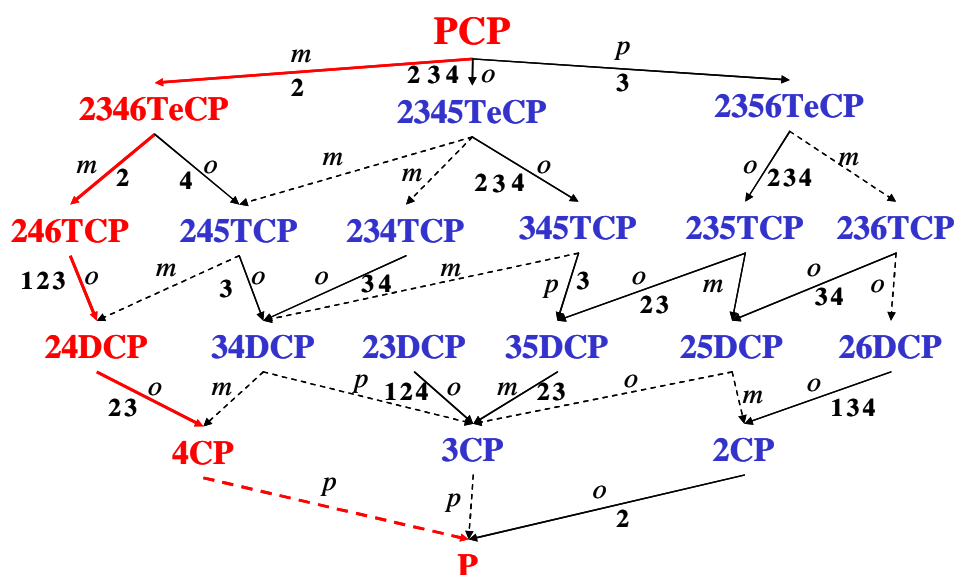


Figura 1.15: Rutas de deshalogenación reductiva del género *Desulfitobacterium* spp. 1: *D. chlororespirans* 2: *D. hafniense* TCP-A 3: *D. hafniense* PCP-1 4: *D. dehalogenans*. Flecha roja: ruta degradativa principal. Flecha negra: otras rutas de *Desulfitobacterium* reconocidas. Flecha discontinua: rutas de otros microorganismos reconocidas. o, m, p: decloración en posiciones orto, meta y para, respectivamente (Utkin et al., 1994; Bouchard et al., 1996; Kennes et al., 1996; Sanford et al., 1996; Holliger et al., 1998; Magar et al., 1999; Breitstein et al., 2001).

1.3.6 Tecnologías de alta eficiencia en la degradación anaerobia de clorofenoles

La degradación de clorofenoles mediante tecnologías anaerobias ha sido estudiada desde principios de los años 80. Con la aparición de las tecnologías de alta eficiencia, el tratamiento de este tipo de compuestos ha experimentado una notable mejoría, alcanzando eficiencias de degradación muy altas en el tratamiento de cualquier tipo de clorofenol (Annachhatre y Ghewala, 1996). En la Tabla 1.2 se muestra un resumen de los últimos estudios sobre el tratamiento de estos compuestos tanto con tecnologías anaerobias de alta eficiencia como con reactores híbridos o secuencias de reactores anaerobio/aerobio.

El clorofenol más estudiado mediante tecnologías anaerobias de alta eficiencia es el PCP (Field y Sierra-Álvarez, 2008). Se ha tratado principalmente con tecnologías basadas en reactores UASB en las que se añadió fuente de carbono como donante de electrones para permitir la decloración reductiva (Hendriksen et al., 1992; Wu et al., 1993; Christiansen y Ahring, 1996b; Tartakovsky et al., 1999, 2001; Guiot et al., 2002; Ye et al., 2004; Shen et al., 2005, 2006). Las cargas estudiadas varían entre 2,2 y 220 mg PCP L⁻¹ d⁻¹, alcanzando en todos los casos conversiones cercanas al 100%. La temperatura de trabajo se encuentra en un abanico entre 25-37 °C. En todos los casos se necesitó un tiempo elevado, superior a 30 d, hasta aclimatar el lodo granular. Este tiempo de aclimatación se puede evitar bioaumentando los reactores con cepas haloinspiradoras, como *Desulfitobacterium hafniense* (Christiansen y Ahring, 1996b; Tartakovsky et al., 1999).

Se ha estudiado el tiempo de aclimatación del lodo anaerobio en reactores discontinuos, encontrando que este periodo depende del tipo de lodo utilizado y que la aclimatación al PCP es mucho más rápida que a MCPs. Además, la adición de un cosustrato carbonoso acelera considerablemente este proceso (Ye y Shen, 2004). También se han empleado reactores FBBR para el tratamiento de PCP (Khodadoust et al., 1997; Magar et al., 1999; Mohn et al., 1999; Koran et al., 2001; Lanthier et al., 2005), con velocidades de carga que varían entre 5 y 315 mg PCP L⁻¹ d⁻¹. Como soportes de adhesión es muy común el uso de carbón activo (Khodadoust et al., 1997; Koran et al., 2001). Además, la adsorción del PCP sobre el carbón activo permite trabajar con cargas elevadas desde el inicio, aunque el gasto en reposición del carbón activo (entre 0,25-0,5 g de carbón L⁻¹ d⁻¹) limita la aplicabilidad de este tipo de tecnologías (Khodadoust et al., 1997).

Otras tecnologías aplicadas a la biodegradación anaerobia de PCP son los recientemente diseñados reactores de flujo horizontal con biomasa inmovilizada, **HAIB** (Damianovic et al., 2009), o los ASBR (Mun et al., 2008b), aunque en estos estudios no se alcanzaron velocidades de carga suficientes para permitir el tratamiento de aguas altamente concentradas (hasta 20 mg PCP L⁻¹ d⁻¹).

Los triclorofenoles han sido también ampliamente tratados mediante reactores anaerobios de alta eficiencia. Entre ellos, el 246TCP ha sido degradado mediante diferentes tipos de reactores anaerobios en los que se obtuvieron resultados bastante dispares (ver Tabla 1.2). En un estudio se utilizó un reactor híbrido EGSB con filtro anaerobio en condiciones

psicrófilas (15 °C), alcanzando rendimientos del 30% para velocidades de carga de 246TCP de 20 mg L⁻¹ d⁻¹, encontrando como productos de la decloración el 24DCP, 4CP y 2CP. No obstante, la capacidad de organismos psicrófilos para la decloración reductiva mostrada en ese estudio es muy interesante debido a que, hasta el momento, todas las bacterias aisladas capaces de realizar halorespiración funcionan en el rango mesófilo (25-37 °C) (Collins et al., 2005).

La decloración reductiva del 246TCP ha sido observada incluso en condiciones aerobias limitantes. En un reactor UASB se estudió la evolución del rendimiento en la degradación del 246TCP y de los metabolitos resultantes (24DCP y 4CP principalmente), así como la eficiencia en la producción de metano y en el consumo de los sustratos utilizados (glucosa, ácido acético y ácido propiónico). Para ello se abordó el proceso en condiciones anaerobias, aerobias y con aeración controlada (aerobias limitantes), encontrando que la regulación de la concentración de O₂ permite maximizar la degradación de monoclorofenoles, alcanzando la completa mineralización de 246TCP, eficiencias de degradación de los cosustratos superiores al 90% y producción de metano. Ello permite afirmar que es posible desarrollar una comunidad heterogénea aerobia-anaerobia, en la cual las bacterias halorespiradoras se encargan de la decloración del 246TCP hasta 4CP, mientras que las bacterias aerobias se ocupan de la oxidación de monoclorofenoles resultantes al tiempo que eliminan el O₂ disuelto del medio, permitiendo así que los metanógenos, situados en el interior de los gránulos, realicen su función en condiciones anaerobias (Gardin et al., 2001).

Empleando reactores anaerobios de lecho fijo en combinación con reactores aerobios de mezcla completa en continuo se observó que la decloración de 246TCP hasta 4CP se produjo en el reactor anaerobio, mientras que el reactor aerobio se consiguió la oxidación de 4CP (Armenante et al., 1999). También se han utilizado barreras reactivas permeables en el tratamiento de concentraciones de 246TCP en torno a 140 mg L⁻¹. Estas barreras, integradas por Pd soportado sobre Fe (2540 µg Pd g⁻¹ Fe), realizaron la completa decloración de 246TCP hasta fenol, que fue posteriormente degradado en un reactor anaerobio de lecho de arena, empleando t_{HR} en torno a 6-10 d. Así, se logró la eliminación completa del 246TCP sin necesidad de aclimatación, aunque el gasto que supone la utilización de este tipo de barreras químicas puede evitarse mediante bioaumentación o utilizando lodo enriquecido (Choi et al., 2007).

Respecto a los diclorofenoles, hasta el momento se ha estudiado el tratamiento del 24DCP únicamente mediante reactores tipo UASB ([Atuanya y Chakrabarti, 2003](#); [Sponza y Uluköy, 2005, 2008](#); [Majumder y Gupta, 2007, 2009](#)), con velocidades de carga comprendidas entre 50,1 y 354,5 mg 24DCP L⁻¹ d⁻¹, empleando molasas, glucosa y acetato como dadores de electrones para la decloración reductiva. En el mejor de los casos se obtuvo una eficiencia del 83% tratando una velocidad de carga de 232 mg 24DCP L⁻¹ d⁻¹ ([Sponza y Uluköy, 2008](#)). Los reactores UASB se han combinado con éxito con reactores aerobios rotativos de contacto (RBC) para el tratamiento conjunto de 24DCP y 2C tratando cargas de ambos compuestos de 60 mg L⁻¹ d⁻¹. Las eficiencias óptimas se lograron trabajando con t_{HR} de 12 h para el reactor UASB y 23 h para el reactor RBC ([Majumder y Gupta, 2007, 2009](#)).

Entre los monoclorofenoles se han estudiado principalmente el 2CP y el 4CP, aunque los resultados de estos estudios son bastante contradictorios. Mientras que en el tratamiento de hasta 1365 mg 2CP L⁻¹ d⁻¹ con reactores FFBR se obtuvieron eficiencias en torno al 80% ([Bajaj et al., 2008](#)), en otro estudio las eficiencias tan sólo fueron del 12% tratando cargas de 4CP de 100 mg L⁻¹ d⁻¹ ([Bali y Sengül, 2003](#)). Esto significa que el 2CP es mucho más susceptible al tratamiento anaerobio que el 4CP. El 4CP se trató mediante reactores FFBR, observándose una inhibición reversible de la digestión de la glucosa y la metanogénesis ([Bali y Sengül, 2003](#)). La utilización de un t_{HR} adecuado (<4 d), unido a un aumento en el periodo de aclimatación, pueden solucionar en parte estos problemas inhibitorios ([Majumder y Gupta, 2008](#)).

Tabla 1.2: Condiciones de estudio y tasas de degradación de clorofenoles en reactores anaerobios de alta eficiencia.

Compuesto	Sistema ¹	Temperatura (°C)	Donante de electrones	Productos	Velocidad de carga máxima (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Eficiencia (%)	Referencia
PCP	UASB	28	AGV y metanol	345TCP, 246TCP, 24DCP, 35DCP	90	99	Wu et al., 1993
PCP	UASB	35	Sacarosa, butirato y etanol	345TCP, 35DCP, 3CP	62	99	Tartakovsky et al., 2001; Guiot et al., 2002
PCP	UASB	37	Glucosa y fenol	2356TeCP, 235TCP, 35DCP	2.2	99	Hendriksen et al., 1992
PCP	UASB	28	Sacarosa y extracto de levadura	NE ²	201	100	Shen et al., 2005
PCP	UASB	28	Sacarosa y extracto de levadura	NE	217	100	Shen et al., 2006
PCP	UASB	28	Sacarosa, peptona y extracto de carne	NE	220	99	Ye et al., 2004
PCP	UASB-b	35	Sacarosa	3CP	80	91 ^a	Tartakovsky et al., 1999
PCP	UASB-b	-	Lactato	345TCP	32	92 ^a	Christiansen y Ahring, 1996b
PCP	FBBR	35	Glucosa o butirato	4CP, 2CP	23	96	Mohn et al., 1999
PCP	FBBR	35	Lactato	34DCP, 4CP	5	NE	Magar et al., 1999
PCP	FFBR	35	Sacarosa, butirato, etanol, extracto de levadura	3CP	313	99	Lanthier et al., 2005

Tabla 1.2 (Continuación)

PCP	FBBR	35	Lechada tipo CERCLA ⁶ y etanol	4CP	222	99	Khodadoust et al., 1997
PCP	FBBR	35	Etolol	4CP, 3CP, 34DCP, 35DCP, P	218	99	Koran et al., 2001
PCP, 2CP, 3CP, 4CP	RMCD	28	Sacarosa	NE	5	NE	Ye y Shen, 2004
PCP	HAIB	30	Glucosa, ácido acético y ácido fórmico	23DCP, 24DCP, 26DCP	2,6	100	Damianovic et al., 2009
PCP	ASBR	TA ³ (24-32)	Sacarosa	345TCP	17,7	85	Mun et al., 2008b
246TCP	EGSB-AF	15	Etolol, AGV	24DCP, 4CP, 2CP	25	30	Collins et al., 2005
246TCP	ASBR	TA (24-32)	Sacarosa	4CP	10	95	Mun et al., 2008a
246TCP	FFBR-CSTR	30	Formiato, acetato	MC ⁴	40,2	100	Armenante et al., 1999
246TCP	USB-AL	35	Glucosa, ácido acético, ácido propiónico	4CP	54,3	100	Gardin et al., 2001
246TCP	PRB-FFBR	TA (23-27)	Lactato, etanol	MC	91,3	100	Choi et al., 2007
246TCP	AFBBR-FBBR	30	ARIR ⁵	MC	197,5	100	Fahmy et al., 1994

Tabla 1.2 (Continuación)

24DCP	UASB-CSTR	37	Moladas	NE	144	86,68	Sponza y Uluköy, 2005
24DCP	UASB	TA (26-33)	Glucosa	NE	354,5	44,8	Atanya y Chakrabarti, 2003
24DCP	UASB	37	Glucosa	NE	232	83	Sponza y Uluköy, 2008
24DCP 2CP	UASB-RBC	TA (23-31)	Acetato	MC	60	100	Majumder y Gupta, 2009
24DCP 2CP	UASB-RBC	TA (23-31)	Acetato	MC	50,1 62,3	99 99	Majumder y Gupta, 2007
4CP	UASB	TA (23-31)	Acetato	MC	160	83	Majumder y Gupta, 2008
4CP	UAFBR	37	Glucosa	NE	100	12	Bali y Sengül, 2003
2CP	FFBR	37	Peptona, extracto de levadura	P	1365	80	Bajaj et al., 2008
345TCP 2CP 3CP 4CP	UASB	-	345TCP, 2CP, 3CP, 4CP	NE	20	40 ^a	Krumme y Boyd, 1988

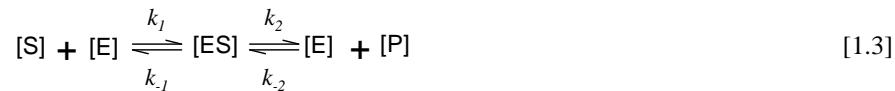
¹UASB-a: Reactor UASB bioaumentado; FFBR: Reactor biológico de lecho fijo; RMCD: Reactor de mezcla completa discontinuo; HAIB: Reactor anaerobio de flujo horizontal con biomasa inmovilizada; ASBR: Reactor discontinuo secuencial anaerobio; EGSB-AF: Híbrido EGSB con filtro anaerobio; CSTR: Reactor continuo de mezcla completa aerobio; USB-AL: Reactor de manto de lodos con limitación de aeración. PRB-FFBR: Barreras reactivas permeables con FFBR; AFBFR-FFBR: Combinación reactores FBFR anaerobio-aerobio; UASB-RBC: Combinación reactores UASB y reactor de contacto rotativo aerobio; UAFBR: Reactor anaerobio de lecho fijo y flujo ascendente; ²NE: No especificado; ³TA: Temperatura ambiente; ⁴MC: mineralización completa; ⁵ARIR: Agua residual industrial real; ⁶CERCLA: Acta de respuesta medioambiental, compensación y responsabilidad. ^aCalculado como porcentaje de decloración

1.4 Modelización matemática de procesos biológicos

1.4.1 Biocinética

La degradación de los compuestos químicos mediante microorganismos se lleva a cabo a través de una serie compleja de reacciones bioquímicas, las cuales son catalizadas por enzimas presentes en todos los seres vivos. Estos catalizadores suelen ser muy específicos, por lo que generalmente cada enzima cataliza una única reacción química. Los microorganismos contienen una gran variedad de enzimas, siendo cada uno de ellos responsables de una parte del complejo proceso del metabolismo biológico (Ramalho, 1991).

La acción de los enzimas se representa por la Ecuación 1.3



En esta ecuación, las k representan las constantes de velocidad de las reacciones químicas. El sustrato (S), se une al enzima (E), formando así el llamado complejo activado (ES). De esta forma, se aumenta la velocidad de reacción frente al proceso en el que estuviese ausente el enzima. Finalmente, el complejo activado se rompe, formando así los productos finales (P) y recuperando el enzima, que puede reutilizarse.

De acuerdo con la irreversibilidad de la rotura del complejo enzima-sustrato, y trabajando en régimen estacionario, los procesos enzimáticos se ajustan al **corolario de Michaelis-Menten**, formulado en 1913 por Leonor Michaelis y Maud Menten. Teniendo en cuenta el crecimiento bacteriano y la velocidad específica de consumo de sustrato, la expresión clásica del modelo de Michaelis-Menten conduce a la Ecuación 1.4.

$$V = k_2 [E_t] \frac{S_e}{K_m + S_e} \quad [1.4]$$

En esta ecuación, V representa la velocidad de consumo de sustrato. El producto $k_2 \cdot [E_t]$ se denomina **velocidad máxima de consumo de sustrato**, y se representa como V_{max} , mientras que K_m se conoce como **constante de saturación** o constante de Michaelis, y representa la concentración de sustrato a la que la velocidad de consumo de sustrato es de la mitad de la velocidad máxima.

La ecuación de Michaelis-Menten simula el comportamiento de una reacción enzimática en condiciones ideales. No obstante, existen una serie de factores que afectan a la velocidad de las reacciones enzimáticas, como el pH, la temperatura y la presencia de inhibidores o de activadores enzimáticos (Prescott et al., 1999). La ecuación de Michaelis ha sido modificada teniendo en cuenta estos factores. La utilización de las constantes biocinéticas es útil para predecir la eficiencia de un proceso biológico y, de esta manera, poder diseñar los bioreactores de manera adecuada. Los modelos enzimáticos han sido tradicionalmente extrapolados en la predicción del comportamiento tanto de microorganismos puros como de comunidades heterogéneas. En los siguientes puntos se desarrollan los principales modelos cinéticos aplicados en el estudio de reactores biológicos.

1.4.2 Modelización de consumo de sustratos

El crecimiento celular generalmente reúne transformaciones respiratorias (fosforilación por transporte de electrones) o fermentativas (fosforilación a nivel de sustrato) de sustratos en productos (catabolismo), las cuales liberan energía en forma de ATP. Esta energía se utiliza para el mantenimiento de las células o para la reproducción celular (anabolismo) (Prescott et al., 1999). La relación entre el sustrato inicial y la biomasa o el producto final determina la eficiencia del anabolismo. Habitualmente, esta eficiencia se determina mediante el **factor de rendimiento de la biomasa** (Y_{XS}), el cual determina la cantidad molar de sustrato que se transforma en células nuevas. Este factor difiere en función de las condiciones redox del medio. Los microorganismos anaerobios presentan valores de 0,05-0,2 g biomasa g^{-1} sustrato, mientras que en los organismos aerobios este valor está próximo a 0,5 g g^{-1} . Habitualmente, el crecimiento microbiano se describe por una serie de expresiones matemáticas de acuerdo a la Ecuación 1.5 (Gavala et al., 2003).

$$V_x = \mu(S, X) \cdot X \quad [1.5]$$

donde V_X representa la **velocidad de crecimiento microbiano** y μ simboliza la **velocidad específica de crecimiento** de los microorganismos. Para determinar el consumo de un sustrato, basta con multiplicar esta ecuación por la inversa de $Y_{X/S}$, obteniendo así la Ecuación 1.6.

$$V_S = \frac{1}{Y_{X/S}} \mu(S, X) \cdot X \quad [1.6]$$

donde V_S representa la velocidad de consumo de sustrato. Existen diferentes modelos cinéticos de acuerdo con la función μ propuesta. A continuación se describen los más relevantes.

1.4.2.1 Modelo de Monod

Se trata de una adaptación de la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1.2) para el crecimiento de microorganismos (Monod, 1949). La velocidad específica de crecimiento de los microorganismos mediante este modelo se describe en la Ecuación 1.7. Combinando esta ecuación con la Ecuación 1.6, se obtiene la ecuación de Monod para el consumo de sustrato (Ecuación 1.8).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} \quad [1.7]$$

$$V_S = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} \cdot X \quad [1.8]$$

en la que K_S representa la constante de saturación o **constante de Monod** y μ_{\max} es la **velocidad específica de crecimiento máxima** alcanzable cuando $S \gg K_S$.

1.4.2.2 Modelo de primer orden

Se trata de una simplificación del modelo de Monod aplicable para consumo de sustratos muy biodegradables que no llegan a saturar los enzimas, en los que $S \ll K_S$, por lo que la Ecuación 1.6 queda simplificada en la Ecuación 1.9.

$$V_s = k_1 \cdot S \cdot X = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S} \cdot K_s} \cdot S \cdot X \quad [1.9]$$

1.4.2.3 Modelo de Hill

Se trata de un modelo basado en la ecuación de Hill (Ecuación 1.10), que describe el **comportamiento alostérico de los enzimas** (Hill, 1910). El modelo se describe en la Ecuación 1.11.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S^{n_H}}{S_{1/2}^{n_H} + S^{n_H}} \quad [1.10]$$

$$V_s = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{\max} \cdot S^{n_H}}{S_{1/2}^{n_H} + S^{n_H}} X \quad [1.11]$$

donde $S_{1/2}$ representa la concentración de ligando de ocupa la mitad de los sitios de unión con el enzima, llamada **constante de disociación microscópica**, y difiere de la constante de saturación de Monod. El parámetro n_H , denominado **coeficiente de Hill**, hace referencia a la **cooperatividad** entre los diferentes ligandos, y alcanza valores superiores a la unidad cuando la cooperatividad es **positiva** (si una molécula ligando se une al enzima, la afinidad de éste por otra molécula ligando aumenta), inferiores a la unidad cuando la cooperatividad es **negativa**, o iguales a la unidad si la cooperatividad es **nula** (Mitavskiy et al., 2009), situación en la que el modelo se asemeja a Monod.

1.4.2.4 Modelo de segundo orden

Es una simplificación del modelo de Hill en la que $S \ll S_{1/2}$ y la cooperatividad es positiva ($n_H=2$). La expresión se describe en la Ecuación 1.12.

$$V_s = k_2 \cdot S^2 \cdot X = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S} \cdot S_{1/2}^2} \cdot S^2 \cdot X \quad [1.12]$$

1.4.2.5 Modelo de Haldane

Se trata de un modelo basado en el postulado enzimático desarrollado por John Burdon Sanderson Haldane en 1930 (Haldane, 1930), el cual propone que existen determinados sustratos que pueden sobrecargar la actividad del enzima, en un proceso denominado autoinhibición o inhibición por sustrato. Este proceso se describe en la Ecuación 1.13. El grupo de Andrews fue el primero en utilizar este modelo para describir el consumo de sustratos por microorganismos (Andrews et al., 1969). El modelo se describe en la Ecuación 1.14.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S + S \cdot \left(\frac{S}{K_I} \right)^n} \quad [1.13]$$

$$V_s = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S + S \cdot \left(\frac{S}{K_I} \right)^n} \cdot X \quad [1.14]$$

, donde K_I representa la **constante de inhibición** y n es el **orden de inhibición**, el cual hace referencia a la proporción de choques entre el sustrato y el enzima que provocan inhibición. El orden de inhibición habitualmente suele ser 1 o 2.

Se han empleado otros modelos para describir el consumo de sustrato y el crecimiento de la biomasa como los de McCarty (McCarty, 1966), Chen-Hashimoto (Chen y Hashimoto, 1980), Contois (Contois, 1959), Grau (Grau et al., 1975), Moser (Moser, 1957), Han-Levenspiel (Han y Levenspiel, 1988), doble de Monod (McGee et al., 1972), Mankad-Bungay (Mankad y Bungay, 1988), o SKIP (Yoon et al., 1977).

1.4.3 Modelización de la metanogénesis

La metanogénesis es el último eslabón de la degradación anaerobia de sustratos. Además, debido a que es la etapa más sensible y lenta dentro del proceso anaerobio, y a que juega un papel fundamental tanto a nivel microecológico como a nivel económico, es muy

común estudiar su cinética de forma independiente. A pesar de ello, se han desarrollado modelos complejos para el estudio de todas las reacciones implicadas en el proceso anaerobio (hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis) (Gavala et al., 2003), de manera que se puedan controlar en cada momento todas las etapas y predecir así episodios inhibitorios sobre alguna etapa. La asociación internacional del agua (IWA) ha desarrollado recientemente un modelo de simulación aplicable principalmente a los digestores anaerobios de fangos (Anaerobic Digestion Model N° 1, **ADM1**, Batstone et al., 2002), en el que todas las etapas se rigen por ecuaciones diferenciales algebraicas que presentan variables de estado dinámicas. Este modelo se ha modificado añadiendo componentes inhibitorios o ecuaciones que describen reacciones físico-químicas abióticas, lo que ha permitido su aplicación a otros procesos, como el tratamiento de aguas residuales industriales (Fezzani y Cheikh, 2009; Gali et al., 2009; Lee et al., 2009; López et al., 2009). En cualquier caso, este modelo presenta limitaciones, como son la imposibilidad de acoplamiento de relaciones sintróficas, de competencia o de simbiosis entre las diferentes comunidades anaerobias en función de las condiciones ambientales.

La velocidad de la metanogénesis se ha modelizado en numerosas ocasiones mediante el modelo de Monod (Kim et al., 1996; Kalyuzhnyi, 1997; Lokshina y Vavilin, 1999; Lokshina et al., 2001; Borja et al., 2005; Fountoulakis et al., 2008; Saravanan y Sreekrishnan, 2008; Qu et al., 2009). También ha sido modelizada mediante el modelo de Haldane cuando el sustrato utilizado provoca autoinhibición (Ljudmila et al., 2001; Pereira et al., 2004). Otros modelos utilizados han sido el modelo de Stover-Kincannon (Kuscu y Sponza, 2009) o modelos de primer orden (García-Ochoa et al., 1999; Rodríguez-Martínez et al., 2002). Los diferentes modelos han sido modificados añadiendo factores inhibitorios, como el pH (Kalyuzhnyi, 1997; Saravanan y Sreekrishnan, 2008) o el amonio (Fountoulakis et al., 2008). La metanogénesis ha sido estudiada de forma diáuxica separando la actividad de los metanógenos acetótrofos e hidrogenótrofos (Kim et al., 1996; Kalyuzhnyi, 1997), sobre todo en estudios basados en el ADM1 (Fountoulakis et al., 2008; Qu et al., 2009). En algunos casos, incluso se han llegado a estudiar simultáneamente las cinéticas de crecimiento y producción de metano de diferentes especies de metanógenos en función de si son acetótrofos estrictos (*Methanosaeta* spp.), acetótrofos facultativos (*Methanosarcina* spp.) o hidrogenótrofos estrictos, siendo cuantificado el crecimiento de cada especie mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (Qu et al., 2009). En otros casos, utilizando lodo

granular, se ha modelizado tanto el consumo de sustrato y producción metanogénica como los fenómenos de transporte entre capas, aplicando la primera ley de Fick (Saravanan y Sreekrishnan, 2008).

El **modelo de Roediger** (Edeline, 1980) se ha utilizado para describir la methanogenesis, simplificando el modelo de Monod a un pseudo-primer orden y considerando constante la cantidad de biomasa. Este modelo, habitualmente utilizado para calcular la actividad metanogénica específica (SMA), se empleó inicialmente para determinar la producción anaerobia de metano en el aparato digestivo humano. El desarrollo de este modelo se presenta en la Ecuaciones 1.15-1.17.

$$G = G_m \cdot (1 - e^{-k_a \cdot t}) \quad [1.15]$$

$$G_m = S_0 \cdot Y_{X/S} \quad [1.16]$$

$$k_{ap} = k_1 \cdot X \quad [1.17]$$

siendo G el volumen de metano producido por unidad de tiempo, G_m el máximo volumen de metano acumulado para un tiempo de digestión infinita, S_0 la concentración inicial de sustrato, k_{ap} la constante cinética aparente y k la constante cinética de primer orden.

1.4.4 Modelización de procesos inhibitorios

La inhibición de un proceso enzimático puede ser debida a la presencia de inhibidores químicos o a las condiciones de pH y temperatura del medio. Para modelizar este tipo de procesos, se emplean factores de inhibición que afectan tanto a la V_{max} como a la K_s . Si estos factores afectan sólo a la K_s , la inhibición es **competitiva**. En este caso, el inhibidor compite con el sustrato por el centro activo del enzima. Si afectan a la V_{max} , es **no competitiva**, en la que el inhibidor se une al enzima en otro lugar diferente al centro activo, variando su conformación e impidiendo la unión del sustrato. Finalmente, si afectan a ambas variables, se denomina **acompetitiva**. En este caso, el inhibidor se une al complejo ES , impidiendo la formación de productos (Núñez, 2001). El factor utilizado para explicar

matemáticamente los procesos inhibitorios se muestra en la Ecuación 1.18. A continuación se describen los principales modelos inhibitorios basados en estos supuestos.

$$\text{Factor de inhibición} = \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) \quad [1.18]$$

1.4.4.1 Inhibición competitiva

Este tipo de inhibición sucede habitualmente con sustratos tóxicos o recalcitrantes que entran en contacto con los microorganismos, obligándoles a utilizarlos en perjuicio de la degradación de otros sustratos mucho más biodegradables. La inhibición desaparece cuando desaparece el sustrato inhibitorio, por lo que normalmente es un tipo de inhibición reversible. Además, al aumentar la concentración del sustrato, el efecto inhibitorio se minimiza. En la Ecuación 1.19 se describe el modelo para el crecimiento específico de los microorganismos asumiendo la cinética de Monod, mientras que la modelización del consumo de sustrato con inhibición competitiva se refleja en la Ecuación 1.20.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{\left(1 + \frac{I}{K_I}\right) \cdot K_S + S} \quad [1.19]$$

$$V_S = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{\mu_{\max} \cdot S}{\left(1 + \frac{I}{K_I}\right) \cdot K_S + S} \cdot X \quad [1.20]$$

En estas ecuaciones, la I representa la concentración de inhibidor. Las situaciones de inhibición competitiva son difíciles de detectar si no se conoce la acción del inhibidor, dado que el término de inhibición $(I/K_I) \cdot K_S$ puede permanecer constante en el caso de que la concentración del inhibidor no disminuya, por lo que se puede confundir con la constante de saturación. Por ello, este factor se denomina **constante de saturación aparente**, K_{Sap} . Se ha aplicado este modelo inhibitorio para reproducir el impacto del co-metabolismo sobre la digestión de sustratos catabólicos. Así, se ha aplicado en el tratamiento de los tintes Direct Black 38 y Azo Direct Yellow 12, que funcionan como inhibidores competitivos de la fermentación de la glucosa (Sponza y Isik, 2004; Isik y Sponza, 2005) o en la degradación

anaerobia de PCE y TCE, en la que el PCE actúa como inhibidor competitivo del TCE (Yu y Semprini, 2004).

1.4.4.2 Inhibición no competitiva

En este caso, este tipo de inhibición sucede con sustratos muy tóxicos como los metales pesados, H₂S o algunos compuestos orgánicos. En condiciones anaerobias, es muy habitual hacer uso de estas expresiones para modelizar la inhibición ejercida por el pH, la concentración de O₂ o la temperatura (Chen et al., 2008). Además, la acción inhibitoria de algunos compuestos orgánicos tóxicos no afecta directamente al metabolismo, sino que disminuye la actividad microbiana interfiriendo en los canales de electrones intermembranales (Sikkema et al., 1995). Los inhibidores no competitivos no afectan la afinidad de los microorganismos por el sustrato, sino que disminuyen la V_{max} del proceso al inactivar una parte de la microbiota. La ecuación de Monod para el crecimiento específico de la biomasa queda modificada tal y como se describe en la Ecuación 1.21. El modelo que predice la velocidad de consumo de sustrato se representa mediante la Ecuación 1.22.

$$\mu = \frac{1}{\left(1 + \frac{I}{K_I}\right)} \cdot \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \quad [1.21]$$

$$V_s = \frac{1}{\left(1 + \frac{I}{K_I}\right)} \cdot \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \cdot X \quad [1.22]$$

En algunas situaciones, el inhibidor no competitivo puede ser el propio producto de la reacción, como en el caso de la transformación de propionato en acetato (Mösche y Jördening, 1999). En este caso, el propionato funciona como inhibidor no competitivo tanto de la degradación de acetato como de la de propionato. La inhibición no competitiva es el modelo más aplicado para el estudio de la inhibición metanogénica (Sossa et al., 2004; Fountoulakis et al., 2008; Saravanan y Sreekrishnan, 2008), siendo, además, el tipo de inhibición utilizado habitualmente para modificar el modelo ADM1 (Tugtas et al., 2006; Ramirez et al., 2009).

1.4.4.3 Inhibición acompetitiva

Los inhibidores acompetitivos ejercen una acción mucho más severa sobre la actividad microbiológica que los competitivos o los no competitivos, dado que disminuyen la afinidad del microorganismo por el sustrato e inactivan gran parte del consorcio biológico. Conjuntamente, muchos tipos de inhibidores acompetitivos pueden ser irreversibles, por lo que cuando sucede un episodio de inhibición acompetitiva sobre un proceso biológico, las consecuencias son más graves (pérdida de biomasa, disminución de la eficiencia, contaminación severa de los efluentes, etc.), provocando a veces el colapso del proceso. La adecuación del modelo de Monod bajo condiciones de inhibición acompetitiva se muestra en la Ecuación 1.23 y la que modeliza el consumo del sustrato para este tipo de inhibición se muestra en la Ecuación 1.24.

$$\mu = \frac{1}{\left(1 + \frac{I}{K_I}\right)} \cdot \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + S} \quad [1.23]$$

$$V_s = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S + S \cdot \left(\frac{I}{K_I}\right)} \cdot X \quad [1.24]$$

Este modelo a menudo se confunde con el modelo de Haldane, aunque la diferencia radica en que en este caso el sustrato no está autoinhibido, y la disminución de la actividad microbiana se debe únicamente a la acción del inhibidor sobre el sustrato (Eker y Kargi, 2006b). Los inhibidores acompetitivos son habitualmente sustratos ligeramente biodegradables por el consorcio biológico, pero muy tóxicos en concentraciones relativamente bajas. En condiciones anaerobias, se han estudiado efectos acompetitivos en la degradación del 24DCP sobre la degradación de ácido acético (Ning et al., 1997). También se han mostrado efectos inhibitorios acompetitivos en un medio con H₂S al ser sometido a concentraciones inhibitorias de cobre (Jin et al., 1998).

1.4.4.4 Modelo de Levenspiel

Se trata de un modelo empírico desarrollado a partir del modelo de Monod, añadiendo un factor de inhibición acumulativa (Levenspiel, 1980). El modelo inhibitorio para la velocidad específica de crecimiento de la biomasa se describe en la Ecuación 1.25, mientras que la velocidad de consumo de sustrato se muestra en la Ecuación 1.26.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \left(1 - \frac{I}{I_M} \right)^c \quad [1.25]$$

$$V_s = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \left(1 - \frac{I}{I_M} \right)^c \cdot X \quad [1.26]$$

donde I_M representa la máxima concentración de inhibidor por encima de la cual no existe actividad microbiana, y c es el **factor de inhibición**. Este modelo ha sido aplicado para describir inhibición en el consumo de sustrato con aguas residuales procedentes de fermentación de aceitunas verdes (Beltran et al., 2008). Kwon et al. (2001) comprobaron que la producción de ácido láctico a partir de glucosa por *Lactobacillus rhamnosus* provoca una inhibición por producto, en la que por encima de 87 g ácido láctico L⁻¹ el consumo de glucosa está completamente inhibido.

Otros modelos que describen diferentes tipos de inhibición competitiva, no competitiva o acompetitiva son el modelo de Orhon y Tünay (1979), el modelo de Grady y Lim (1980), el modelo de Luong (1987), el modelo de Han y Levenspiel para la inhibición por producto (Han y Levenspiel, 1988), el modelo de Heuvel y Beftink (Beftink y van den Heuvel, 1990) o el modelo de Gonçalves (Gonçalves et al., 1991), entre otros. Chen et al. (2008) han recopilado los diferentes tipos de inhibición de la digestión anaerobia en función del compuesto inhibitorio y el proceso metabólico al que afecta.

1.4.5 Modelización matemática en la biodegradación de clorofenoles

Los primeros estudios sobre cinética de degradación de clorofenoles y sobre los efectos inhibitorios que éstos provocan sobre el metabolismo microbiano fueron planteados

inicialmente utilizando cultivos puros (Karns et al., 1983), o bien consorcios aerobios o anaerobios en cultivos discontinuos (Beltrame et al., 1982; Zhang y Wiegel, 1990). Los estudios enfocados a la determinación de los parámetros cinéticos en el diseño de reactores biológicos no aparecieron hasta mediados de los años 90, coincidiendo con la instalación de las primeras plantas de tratamiento de aguas residuales industriales contaminadas con clorofenoles (Christiansen et al., 1995). Desde entonces, el progreso sobre esta materia ha sido evidente.

En la Tabla 1.3 se recoge un resumen de los principales estudios sobre cinética de degradación de clorofenoles en condiciones tanto aerobias como anaerobias. El desarrollo de modelos cinéticos en condiciones aerobias ha sido tradicionalmente más estudiado que en condiciones anaerobias. La columna titulada “proceso” hace referencia al papel que juega el clorofenol en el trabajo descrito. Bajo condiciones aerobias los clorofenoles sólo pueden funcionar como dadores de electrones. Así, en esas condiciones existen dos tipos principales de procesos: aquellos en los que el clorofenol funciona como fuente de carbono y energía (CS) o bien aquellos en los que la degradación del clorofenol es realizada de forma cometabólica, por lo que deben existir otros compuestos orgánicos como dadores de electrones (CDQO). Evidentemente, bajo esta última circunstancia, no existe crecimiento biológico debido a la degradación del clorofenol. En condiciones anaerobias, en cambio, los clorofenoles pueden funcionar como dadores o aceptores de electrones. El primer caso sólo está recogido en el trabajo de Bae et al. (2002). En el resto de estudios, el clorofenol funciona como aceptor de electrones. Bajo esta circunstancia, pueden existir tres posibles situaciones: (a) el clorofenol se degrada mediante mecanismos abióticos, por lo que tanto el dador como el aceptor de electrones son compuestos no clorofenólicos (CDQO, M); (b) el clorofenol funciona como aceptor de electrones a través de procesos de decloración reductiva cometabólica, por lo que la biomasa no obtiene energía del proceso y, por tanto, no crece debido a la decloración reductiva (DR, M); y (c) el clorofenol funciona como aceptor de electrones mediante decloración reductiva halorespirativa, por lo que la biomasa es capaz de crecer al realizar este proceso (CDQO, HR).

El crecimiento de microorganismos habitualmente se describe mediante un primer orden, en el que la velocidad de crecimiento (k) condicionará la velocidad de consumo del sustrato en función del factor de rendimiento de la biomasa ($Y_{X/S}$). En condiciones aerobias,

las bacterias capaces de crecer a través del consumo de clorofenoles presentan velocidades de crecimiento elevadas, a menudo por encima de 2 d^{-1} . En condiciones anaerobias, estos valores son varios órdenes de magnitud inferiores. Por otro lado, en condiciones aerobias el valor de Y_{XS} disminuye según se aumenta el grado de cloración del anillo fenólico. Para DCP y TCP, este valor se sitúa entre 0,132 y 0,421 $\text{g SSV g}^{-1} \text{ CP}$, mientras que en la degradación de PCP, los valores se encuentran en el intervalo 0,054–0,190 g g^{-1} . En condiciones anaerobias, las bacterias capaces de realizar halorespiración presentan valores de Y_{XS} muy bajos (0,016 – 0,052 g g^{-1}). La combinación de estos valores con elevadas tasas de crecimiento de las bacterias halorespiradoras explica que las velocidades específicas máximas de consumo de sustrato ($V_{es_{max}}$) sean bastante similares a las de las bacterias aerobias, a pesar de que la actividad de éstas es muy superior. Esto indica que la mayor parte del metabolismo de las bacterias anaerobias halorespiradoras funciona únicamente para la obtención de energía de la dechloración reductiva, por lo que necesitan del aporte de otros aceptores de electrones para poder crecer.

El intervalo encontrado en los valores de las constantes de saturación de Monod establecidas en condiciones aerobias es muy amplio. En casos en los que se trabaja con concentraciones de decenas o centenas de mg L^{-1} , éstos valores se sitúan entre 7,2 mg L^{-1} para el PCP (Wittmann et al., 1998) y 1104 mg L^{-1} para el 4CP (Sahinkaya y Dilek, 2005). En cambio, en estudios que tratan concentraciones por debajo de 10 mg L^{-1} , se sitúan entre 0,06 y 5,74 mg L^{-1} . Tratando concentraciones tan bajas, es posible que la curva de velocidad del modelo de Monod no haya comenzado a variar asintóticamente, por lo que las variables calculadas mediante métodos integrales son discutibles. Los modelos utilizados para explicar el comportamiento de los microorganismos aerobios suelen estar basados en los modelo de Monod (Chudoba et al., 1989; Edgehill y Finn, 1982; Karamanev y Samson, 1998; Witmann et al., 1998) o Haldane (Tyler y Finn, 1974; Klecka y Maier, 1985; Hu et al., 1992; Radehaus y Schmidt, 1992; Kargi y Eker, 2004; Sahinkaya y Dilek, 2005; Wang et al., 2007b), aunque se han empleado modelos muy variados. En condiciones anaerobias, en cambio, la utilización de modelos cinéticos que expliquen episodios inhibitorios en la biodegradación de clorofenoles está aún en desarrollo. En la Tabla 1.3 cabe señalar como única excepción el trabajo de Ning et al. (1997), en el cual emplearon un modelo de Haldane modificado para explicar la biodegradación de 24DCP mediante biopelículas aclimatadas.

Tabla 1.3: Parámetros cinéticos en tratamiento biológico de clorofenoles

Sustrato	Condiciones	Cultivo	Modelo	Proceso*	Crecimiento de biomasa	Constantes**	Referencia
4CP	Aerobiosis, 25 °C	Lodo activo aclimatado	Haldane	CDQO	No	$Ve_{s_{max}}=41,17$; $K_s=1,10$; $K_i=194,4$	Sahinkaya y Dilek, 2005
4CP	Aerobiosis, 26 °C, pH=7,2	Lodo activo aclimatado	Haldane	CS	No	$Ve_{s_{max}}=2208$; $K_s=1104$; $K_i=194,4$	Sahinkaya y Dilek, 2006a
4CP	Aerobiosis, 25 °C, pH=7,5	Lodo activo aclimatado	Inhibición competitiva (molasa) y descomposición endógena	CS	Si	$\mu_{max}=1,44$; $K_s=25,7$; K_i (para k)=559; K_i (para K_s)=17; $Y_{x/s}=0,206$; $b=4,7 \cdot 10^{-5}$; $K_b=3,4 \cdot 10^9$	Konya et al., 2007
Molasa			Inhibición competitiva (4CP) y descomposición endógena			$\mu_{max}=2,64$; $K_s=559$; K_i (para k)=3,2 10^5 ; K_i (para K_s)=4,1 10^6 ; $Y_{x/s}=0,34$; $b=0,136$; $K_b=0,071$	
24DCP	Aerobiosis, 20 °C, pH=7,5	Lodo activo aclimatado	Monod	CS	Si	$Ve_{s_{max}}=5,6$; $K_{COD}=0,6$; $Y_{x/s}=0,37$; $b=0,86$; $\mu_{max}=2,07$	Chudoba et al., 1989
24DCP	Aerobiosis, 25 °C, pH= 7,4	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIB9340	Haldane	CS	Si	$K_s=11,7$; $K_i=35,7$; $\mu_{max}=5,47$	Tyler y Finn, 1974
24DCP	Aerobiosis, 30 °C, pH=7	<i>Pseudomonas putida</i>	Haldane	CS	No	$Ve_{s_{max}}=41,76$; $K_s=112$; $K_i=420$	Kargi y Eker, 2004
24DCP	Aerobiosis, 25 °C	Lodo activo aclimatado	Haldane	CDQO	No	$Ve_{s_{max}}=11742$; $K_s=587$; $K_i=19,1$	Wang et al., 2007
26DCP	Aerobiosis, 25 °C, pH=7	Lodo activo aclimatado	Primer orden	CS	No	$k=6$	Andreozzi et al., 2006
246TCP	Aerobiosis, 30 °C, pH=7,2	<i>Arthrobacter</i> sp.	Primer orden	CDQO	Si	$k=8,64$ $k=3,12$; $Y_{x/s}=0,26$	Stanlake y Finn, 1982

Tabla 1.3 (Continuación)

246TCP	Aerobiosis, pH=7	Biopelícula aclimatada	Michaelis-Menten	CS	No	Melin et al., 1998
	16,5 °C,					$V_{max}=2083; K_M=4,2$
	12,5 °C					$V_{max}=381; K_M=5,3$
	10 °C					$V_{max}=310; K_M=3,6$
	8 °C					$V_{max}=219; K_M=3,2$
2346TeCP	16,5 °C					$V_{max}=1037; K_M=5,5$
	12,5 °C					$V_{max}=261; K_M=7,0$
	10 °C					$V_{max}=310; K_M=4,5$
	8 °C					$V_{max}=192; K_M=4,5$
PCP	16,5 °C		Inhibición competitiva (PCP – 246TCP + 2346TeCP)			$V_{max}=54; K_M=0,6; K_i=0,22$
	12,5 °C					$V_{max}=16; K_M < 0,1; K_i=0,22$
	10 °C					$V_{max}=23; K_M < 0,1; K_i=0,22$
	8 °C					$V_{max}=15; K_M < 0,1; K_i=0,22$
PCP	Aerobiosis	Biopelícula aclimatada	Monod	CS	Si	$K_s=5,74; \mu_{max}=0,384; Y_{X/S}=0,045$ Karamanev y Samson, 1998
PCP	Aerobiosis, 30 °C, pH=7,2	Cultivo enriquecido	Primer orden	CS	Si	$V_{eS,max}=12280; k=0,84; Y_{X/S}=0,081$ Rutgers et al., 1993
PCP	Aerobiosis, 20 °C, pH=7	Cultivo enriquecido	Haldane	CS	Si	$K_s=0,06; K_i=0,14; Y_{X/S}=0,136; \mu_{max}=1,18$ Klecka y Maier, 1985
PCP	Aerobiosis,	<i>Pseudomonas</i> sp. RA2	Haldane	CS	Si	$\mu_{max}=2,16; Y_{X/S}=0,1; K_i=155$ Radehaus y Schmidt, 1992

Tabla 1.3 (Continuación)

PCP	Aerobiosis, 30 °C, <i>Arlthrobacter</i> sp. pH=7,2	Primer orden	CDQO	Si	$k=2,4-1,2; Y_{X/S}=0,15$	Stanlake y Finn, 1982
PCP	Aerobiosis, pH=7,4 <i>Arlthrobacter</i> sp.	Monod	CS	Si	$\mu_{max}=3,70; K_s=1,10;$ $Y_{X/S}=0,160$	Edgehill y Finn, 1982
PCP	Aerobiosis, 30 °C, <i>Sphingomonas</i> sp. P5 pH=7,2	Primer orden	CS	Si	$\mu_{max}=3,41; Y_{X/S}=0,076$	Rutgers et al., 1996
PCP	Aerobiosis, pH=7,4Lodo activo aclimatado	Primer orden	CDQO	Si	$\mu_{max}=2,30; Y_{X/S}=0,190$	Edgehill y Finn, 1983
PCP	Aerobiosis, 25-30 °C, <i>Flavobacterium</i> sp. ATCC 39723 pH =7,3	Haldane + adsorción	CDQO	Si	$\mu_{max}=7,2; K_s=25; K_i=1,5;$ $Y_{X/S}=0,12; k_d=0,048$	Hu et al., 1994
PCP	Aerobiosis <i>Sphingomonas</i> <i>chlorophenolica</i> RA2	Monod	CDQO	Si	$VeS_{max}=2015; K_s=7,2;$ $\mu_{max}=5,04$	Wittmann et al., 1998
	<i>Mycobacterium</i> <i>chlorophenolicum</i> PCP-1				$VeS_{max}=256; K_s=0,69;$ $\mu_{max}=0,58$	
DQO	Aerobiosis, 25 °C, Biopelícula aclimatada pH=7,5	Inhibición no competitiva (24DCP)	CS	No	$V_{max}=8397; K_s=81; K_i=26$	Eker y Kargi, 2006
246TCP	Aerobiosis, 30 °C, <i>Rhodococcus</i> <i>rhodochrous</i> pH=7	Inhibición no competitiva (24DCP)	CDQO	No	$VeS_{max}=64,56; K_s=75,33;$ $K_i=338$	Pamukoglu y Kargi, 2008
2CP	Anaerobiosis, 25 °C, pH=7,2	Cultivo enriquecido	CS	Si	$k=0,0139$	Bae et al., 2002
2CP	Anaerobiosis, 25 °C, pH=7,5	Cepa no identificada	CDQO, HR Si		$k=0,27$	Cole et al., 1994
2CP	Anaerobiosis, 30 °C, pH=7,5	<i>Anaeromyxobacter</i> <i>dehalogenans</i>	CDQO, HR Si		$k=1,39$	Sanford et al., 2002
2CP	Anaerobiosis, 30 °C, pH=7	<i>A. dehalogenans</i> (no inducido)	CDQO, HR Si		$VeS_{max}=212,8$	He y Sanford, 2002

Tabla 1.3 (Continuación)

2CP	Anaerobiosis, 30 °C, pH=7	<i>A. dehalogenans</i> (inducido)	Orden 0	CDQO, HR Si	$VeS_{max}=178,9$	He y Sanford, 2002
2CP	Anaerobiosis, 30 °C, pH=7	<i>A. dehalogenans</i>	Primer orden	CDQO, HR Si	$k=0,71$	He y Sanford, 2004
2CP	Anaerobiosis, 30 °C, pH=7	<i>A. dehalogenans</i>	Primer orden	CDQO, HR Si	$k=1,63$; $Y_{XS}=0,052$	He y Sanford, 2003
2CP	Anaerobiosis, 25 °C, pH=7,5	<i>Desulfovibrio dechloracetivorans</i>	Primer orden	CDQO, HR Si	$k=0,83$; $Y_{XS}=0,016$	Sun et al., 2000
2CP	Anaerobiosis, pH=7,5 15 °C 37 °C	Biopelícula aclimatada	Orden 0	CDQO, M No	$VeS_{max}=4,84$ $VeS_{max}=8,05$ $V_{max}=115-175$	Collins et al., 2005 Bajaj et al., 2008
2CP	Anaerobiosis, 37 °C, pH=7,3	Lodo activo aclimatado	Orden 0	DR, M No	$V_{max}=873$ $k=0,035$	Takeuchi et al., 2000
2CP	Anaerobiosis, 25°C	Biopelícula aclimatada	Primer orden	DR, M No	$V_{max}=56$; $K_s=16$	Atuanya y Chakrabarti, 2003
2CP	Anaerobiosis, 28-33 °C, pH=7,2-7,4	Lodo granular no aclimatado	Monod	DR, M No	$k=0,028$	Takeuchi et al., 2000
3CP	Anaerobiosis, 25°C	Lodo activo no aclimatado	Primer orden	DR, M No		Collins et al., 2005
4CP	Anaerobiosis, pH=7,5 15 °C 37 °C	Biopelícula aclimatada	Orden 0	CDQO, M No	$VeS_{max}=4,94$ $VeS_{max}=8,21$	

Tabla 1.3 (Continuación)

4CP	Anaerobiosis, 28-33 °C, pH=7,2-7,4	Lodo granular no aclimatado	Monod	DR, M	No	$V_{max}=71; K_s=108$	Atuanya y Chakrabarti, 2003
23DCP	Anaerobiosis, 37 °C, pH=7,5	<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	Primer orden	CDQO, HR	No	$k X^{-1}=465,6$	Utkin et al., 1995
23DCP	Anaerobiosis, 25°C	Lodo activo no aclimatado	Primer orden	DR, M	No	$k=0,025$	Takeuchi et al., 2000
24DCP	Anaerobiosis, 35 °C, pH=7,5	Biopelícula aclimatada	Haldane modificado	DR, M	No	$VeS_{max}=3,36; K_s=2,06; K_i=65,1$	Ning et al., 1997
24DCP	Anaerobiosis, 37 °C, pH=7,5	<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	Primer orden	CDQO, HR	No	$k X^{-1}=8,64$	Utkin et al., 1995
24DCP	Anaerobiosis, pH=7,5	Biopelícula aclimatada	Orden 0	CDQO, M	No		Collins et al., 2005
	15 °C					$VeS_{max}=4,08$	
	37 °C					$VeS_{max}=6,97$	
24DCP	Anaerobiosis, T ^a ambiente, pH=7,3-7,4	Biopelícula aclimatada	Monod	DR, M	No	$V_{max}=883; K_s=0,0,05$	Magar et al., 1999
24DCP	Anaerobiosis, 37 °C, pH=7	Lodo granular no aclimatado	Monod con descomposición endógena	DR, M	Si	$\mu_{max}=0,41; K_s=2,02; Y_{X/S}=0,0017; K_d=3,1 \cdot 10^{-5}$	Sponza y Uluköy, 2008
			Grau 2° orden			$a=0,541; b=0,98; k_2=0,30$	
			Stover-Kincannon			$K_p=9,8 \cdot 10^{-3}; U_{max}=10$	
24DCP	Anaerobiosis, 25°C	Lodo activo no aclimatado	Primer orden	DR, M	No	$k=0,041$	Takeuchi et al., 2000
24DCP	Anaerobiosis, 28-33 °C, pH=7,2-7,4	Lodo granular no aclimatado	Monod	DR, M	No	$V_{max}=244; K_s=117$	Atuanya y Chakrabarti, 2003

Tabla 1.3 (Continuación)

25DCP	Anaerobiosis, 25°C Lodo activo no aclimatado	Primer orden	DR, M	No	$k=0,018$	Takeuchi et al., 2000
26DCP	Anaerobiosis, 37 °C, pH=7,5 <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	Primer orden	CDQO, HR	No	$k X' = 67,2$	Utkin et al., 1995
26DCP	Anaerobiosis, 25 °C, pH=7,5 <i>Desulfovibrio dechloracetivorans</i>	Primer orden	CDQO, HR	No	$Y_{X/S}=0,033$	Sun et al., 2000
26DCP	Anaerobiosis, 25°C Lodo activo no aclimatado	Primer orden	DR, M	No	$k=0,024$	Takeuchi et al., 2000
35DCP	Anaerobiosis, 37 °C, pH=7,0-7,5	Orden 0	DR, M	No	$V_{eS_{max}}=0,372$	Hendriksen y Ahring, 1992
35DCP	Anaerobiosis, 25°C Lodo activo no aclimatado	Primer orden	DR, M	No	$k=0,021$	Takeuchi et al., 2000
234TCP	Anaerobiosis, 25°C Lodo activo no aclimatado	Primer orden	DR, M	No	$k=0,073$	Takeuchi et al., 2000
235TCP	Anaerobiosis, 37 °C, pH=7,0-7,5	Orden 0	DR, M	No	$V_{eS_{max}}=1,11$	Hendriksen y Ahring, 1992
235TCP	Anaerobiosis, 25°C Lodo activo no aclimatado	Primer orden	DR, M	No	$k=0,042$	Takeuchi et al., 2000
236TCP	Anaerobiosis, 25°C Lodo activo no aclimatado	Primer orden	DR, M	No	$k=0,030$	Takeuchi et al., 2000
245TCP	Anaerobiosis, T ^a ambiente, pH=7,3-7,4	Monod	DR, M	No	$V_{max}=1507; K_i=0,16$	Magar et al., 1999
245TCP	Anaerobiosis, 25°C Lodo activo no aclimatado	Primer orden	DR, M	No	$k=0,056$	Takeuchi et al., 2000
246TCP	Anaerobiosis, 37 °C, pH=7,5 <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	Primer orden	CDQO, HR	No	$k X' = 14,16$	Utkin et al., 1995

Tabla 1.3 (Continuación)

246TCP	Anaerobiosis, pH=7,5 15 °C 37 °C	Biopelícula aclimatada	Orden 0	CDQO, M	No	$V_{eS_{max}}=3,11$ $V_{eS_{max}}=6,57$	Collins et al., 2005
246TCP	Anaerobiosis, T ^a ambiente, pH=7,3-7,4	Biopelícula aclimatada	Monod	DR, M	No	$V_{max}=777; K_s=0,02$	Magar et al., 1999
246TCP	Anaerobiosis, 25°C Lodo activo no aclimatado		Primer orden	DR, M	No	$k=0,035$	Takeuchi et al., 2000
246TCP	Anaerobiosis, T ^a ambiente, pH=7,4	Biopelícula aclimatada	Primer orden	DR, M	No	$k=0,01-1,64$	Antizar-Ladislao y Galil, 2006
246TCP	Anaerobiosis, 28-33 °C, pH=7,2-7,4 aclimatado	Lodo granular no aclimatado	Monod	DR, M	No	$V_{max}=68; K_s=23$	Atuanya y Chakrabarti, 2003
345TCP	Anaerobiosis, T ^a ambiente, pH=7,3-7,4	Biopelícula aclimatada	Monod	DR, M	No	$V_{max}=1178; K_s=0,05$	Magar et al., 1999
2345TeCP	Anaerobiosis, T ^a ambiente, pH=7,3-7,4	Biopelícula aclimatada	Monod	DR, M	No	$V_{max}=1837; K_s=0,09$	Magar et al., 1999
2345TeCP	Anaerobiosis, 25°C Lodo activo no aclimatado		Primer orden	DR, M	No	$k=0,073$	Takeuchi et al., 2000
2346TeCP	Anaerobiosis, T ^a ambiente, pH=7,3-7,4	Biopelícula aclimatada	Monod	DR, M	No	$V_{max}=1232; K_s=0,01$	Magar et al., 1999
2346TeCP	Anaerobiosis, 25°C Lodo activo no aclimatado		Primer orden	DR, M	No	$k=0,080$	Takeuchi et al., 2000
2356TeCP	Anaerobiosis, 37 °C, pH=7,0-7,5	Biopelícula aclimatada	Orden 0	DR, M	No	$V_{eS_{max}}=0,71$	Hendriksen y Ahring, 1992

Tabla 1.3 (Continuación)

2356TeCP	Anaerobiosis, 25°C Lodo activo no aclimatado	Primer orden	DR, M	No	$k=0,050$	Takeuchi et al., 2000
PCP	Anaerobiosis, 25 °C, pH=7,2-7,3	Biopelícula aclimatada Orden 0	DR, M	No	$V_{max}=19,1$	Wu et al., 1993
PCP	Anaerobiosis, 37 °C, pH=7,5	Biopelícula aclimatada Orden 0	DR, M	No	$V_{max}=4$	Guiot et al., 2002
PCP	Anaerobiosis, 37 °C, pH=7,0-7,5	Biopelícula aclimatada Monod	DR, M	No	$K_s=0,58$; $V_{ES_{max}}=0,40$	Hendriksen y Ahring, 1992
PCP	Anaerobiosis, 35 °C, pH=7	Biopelícula aclimatada Orden 0	DR, M	No	$V_{max}=5,26$	Mohn et al., 1999
PCP	Anaerobiosis, 28 °C	Biopelícula aclimatada Orden 0	DR, M	No	$V_{ES_{max}}=9,95$	Ye et al., 2004
PCP	Anaerobiosis, T ^a ambiente, pH=7,3-7,4	Biopelícula aclimatada Monod	DR, M	No	$V_{max}=1550$; $K_s=0,11$	Magar et al., 1999
PCP	Anaerobiosis, 30 °C	Cultivo enriquecido Primer orden	CDQO, HR Si		$k=0,41$	Stuart y Woods, 1998
PCP	Anaerobiosis, 37 °C, pH=7,5	<i>Desulfotobacterium dehalogenans</i> Primer orden	CDQO, HR No		$k X' = 11,76$	Utkin et al., 1995
PCP	Anaerobiosis,	<i>Desulfomonile tiedjei</i> Orden 0	CDQO, HR No		$V_{ES_{max}}=86,3$	Mohn y Kennedy, 1992
PCP	Anaerobiosis, 25°C Lodo activo no aclimatado	Primer orden	DR, M	No	$k=0,161$	Takeuchi et al., 2000
PCP	Anaerobiosis, 28-33 °C, pH=7,2-7,4	Lodo granular no aclimatado Monod	DR, M	No	$V_{max}=66$; $K_s=16$	Atuanya y Chakrabarti, 2003

* CDQO: Consumo de materia orgánica (co-metabolismo); CS: Consumo del clorofenol como sustrato; DR: Declaración reductiva; M: Metanogénesis, HR: Halorespiración.

** V_{max} , K_s (mg clorofenol L⁻¹ d⁻¹); $V_{ES_{max}}$, U_{max} (mg clorofenol g⁻¹ SSV d⁻¹); K_s , K_d , K_d (mg L⁻¹); k , k_2 , μ_{max} , b , (d⁻¹); a , b (adimensional); X (g SSV L⁻¹).

*** NE: No especificado

CAPÍTULO 2

DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE 24DCP MEDIANTE REACTORES UASB Y EGSB



*La actitud científica implica lo que yo denomino el
postulado de objetividad, es decir, el postulado
fundamental de que no existe un plan, de que no hay
intención en el universo.*

J. -L. Monod

Resumen:

Se ha estudiado la degradación anaerobia de 24DCP en reactores UASB y EGSB. El comportamiento de ambos reactores fue evaluado y comparado en términos de eficiencia de degradación de 24DCP y DQO, producción de metano, estabilidad, adaptabilidad del lodo granular, así como su recuperación tras los procesos de inhibición microbiana. Para ello, se incrementó progresivamente la concentración de 24DCP y la VCO. Se obtuvieron eficiencias de degradación de DQO y 24DCP del 84 y 80% (EGSB) y 75 y 61% (UASB), respectivamente, para una VCO de $1,9 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y una velocidad de carga de 24DCP de $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. En estas condiciones, la producción de metano en el reactor UASB fue despreciable, mientras que en el reactor EGSB se alcanzó un valor del 22% respecto al valor teórico máximo, lo que pone de manifiesto la diferencia con respecto a la inhibición de la actividad metanogénica entre estos dos sistemas. Al disminuir la velocidad de carga de 24DCP hasta un valor en torno a $30 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, se observó una mejora notable de la metanogénesis en ambos reactores, siendo la actividad metanogénica del reactor EGSB superior que la del reactor UASB (47 y 37% del valor teórico máximo, respectivamente). Por otra parte, se mejoró la eficiencia de decoloración en ambos reactores desde valores en torno a 20% hasta el 80% al reducir la VCO a la mitad, reduciéndose considerablemente en ambos casos la concentración de salida de 4CP. En cambio, para concentraciones de entrada de $210 \text{ mg 24DCP L}^{-1}$ esta eficiencia sufrió una dramática caída en el reactor UASB debido a la inhibición en la degradación del 24DCP, mientras que en el reactor EGSB se mantuvieron las eficiencias de decoloración. Finalmente, estudios de SEM mostraron que se conserva la morfología del lodo granular de ambos reactores, aunque con una mayor proporción de SSV en el lodo extraído del reactor EGSB.

2.1 Introducción

Los clorofenoles son compuestos tóxicos y recalcitrantes que pueden estar presentes en aguas residuales industriales y en acuíferos debido a que se utilizan en la producción de herbicidas, insecticidas, antisépticos, desinfectantes y en preservantes de la madera (Ning et al., 1997; Krumme y Boyd, 1998). Debido a su toxicidad, algunos de ellos están incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la US-EPA y en el marco Europeo de política sobre el agua establecido en la **Directiva 2000/60/CE**.

La eliminación de clorofenoles del agua ha sido investigada recientemente. La adsorción, el método no destructivo más común, concentra los clorofenoles en fase sólida, transfiriendo el problema a un residuo sólidos (Dabrowski et al., 2005). Los métodos destructivos, tanto los químicos como los biológicos, permiten la mineralización de los clorofenoles y, a veces, se utilizan en combinación. Los métodos químicos son rápidos (Pera-Titus et al., 2004), aunque pueden generar intermedios más tóxicos que los contaminantes de partida. Los tratamientos biológicos, tanto aerobios como anaerobios, han sido ampliamente utilizados en el campo de las aguas residuales porque pueden obtener altos rendimientos a costes reducidos. De todas formas, cuando el medio líquido contiene compuestos tóxicos, los tratamientos biológicos convencionales no son adecuados (Speece, 1996). En condiciones anaerobias tiene lugar la decoloración reductiva y la halorespiración en los enlaces C-Cl de los clorofenoles, produciendo así compuestos menos refractarios, mientras que en condiciones aerobias se pueden generar catecoles y otros compuestos tóxicos si la oxidación es incompleta (Annachatre y Gheewala, 1996).

El 24DCP es uno de los clorofenoles de mayor presencia en el medio ambiente a causa de su utilización como intermedio en la producción de 24D, un herbicida de uso muy extendido. La biodegradación anaerobia de este compuesto es preferible a la aerobia debido principalmente a que la actividad de los microorganismos aerobios se inhibe rápidamente para velocidades de carga de 24DCP por encima de $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Sahinkaya y Filiz, 2007). La degradación anaerobia del 24DCP sucede a través de la siguiente ruta metabólica (Zhang y Wiegel, 1990): $24\text{DCP} \rightarrow 4\text{CP} \rightarrow \text{Ph} \rightarrow \text{Benzoato} \rightarrow \text{AGV} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$. La decoloración de 4CP es el paso limitante debido a que el tiempo requerido para la adaptación de un lodo anaerobio a este compuesto es bastante elevada, a menudo superior a 30 d (Kennes et al.,

1996). Este hecho es consecuencia de que existen muy pocas bacterias con capacidad para decolorar clorofenoles en posición *para* (Magar et al., 1999). Incluso el género *Desulfitobacterium*, uno de los taxones capaces de realizar decoloración reductiva más estudiados, no puede decolorar 4CP (Villemur et al., 2006). A pesar de ello, la biodegradación completa del 4CP es posible (Majunder y Gupta, 2008).

Por otra parte, se ha comprobado que la adición de otra fuente de carbono en un medio anaerobio permite mitigar los efectos tóxicos de los clorofenoles, bien utilizando compuestos puros (Atuanya y Chakrabarti, 2003), o bien mezclas orgánicas (Ye and Shen, 2004). Atuanya y Chakrabarti (2004) estudiaron la biodegradación del 24DCP en presencia de glucosa como cosustrato en un reactor UASB. Los resultados de este estudio demostraron que la biodegradación del 24DCP depende en gran medida de la concentración de glucosa, ya que con fuente de carbono excedentaria, la velocidad de consumo de 24DCP fue independiente de la concentración de nutrientes en el medio, mientras que a concentraciones de cosustrato inferiores, sólo los enzimas con mayor afinidad por el sustrato contribuyeron significativamente en la velocidad de degradación. De esta forma, ajustando adecuadamente la concentración de glucosa se permite optimizar la degradación del 24DCP. Los mejores resultados (70,4% de degradación del 24DCP para un t_{HR} de 13,2 h) se lograron para concentraciones de 24DCP y glucosa de 124 y 500 mg L⁻¹, respectivamente.

El reactor UASB ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de aguas residuales industriales, demostrándose su elevada eficacia para VCO medias y altas en un amplio intervalo de t_{HR} (3-48 h) (Seghezzi et al., 1988). Además, es uno de los sistemas más extendidos en el tratamiento biológico de aguas contaminadas con compuestos fenólicos (Veeresh et al., 2005). El reactor EGSB es una modificación de la configuración tradicional UASB. En ambos la biomasa se encuentra en forma de lodo granular, pero las condiciones hidrodinámicas son diferentes, ya que la velocidad superficial en el reactor EGSB (2-10 m h⁻¹) es muy superior a la aplicada en el reactor UASB (1 m h⁻¹ como máximo), debido al elevado caudal de recirculación y a una mayor relación altura:diámetro en el reactor EGSB. Estas características mejoran la mezcla y el contacto entre el agua residual y los microorganismos, al tiempo que diluyen sustancialmente la concentración de entrada de compuestos tóxicos (Franklin et al., 1992; Zoutberg y Frankin, 1996).

En este capítulo se estudia la degradación anaerobia del 24DCP utilizando reactores UASB y EGSB y glucosa como fuente de carbono y energía (cosustrato). Estos dos tipos de sistemas se comparan en términos de consumo de DQO, biodegradación de 24DCP, producción de metano, estabilidad del proceso y adaptabilidad de los microorganismos a este compuesto.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Configuración de los reactores

Los experimentos se realizaron en reactores UASB y EGSB de 5,4 L termostatizados a 30 ± 1 °C, con un diámetro interno de 10 cm y una altura de 72,5 cm. Están provistos de un separador de gas-sólido-líquido situado a 15 cm de la parte superior de los reactores. La alimentación se introduce mediante bombas peristálticas, así como la recirculación en el caso del reactor EGSB (velocidad ascensional = $2,5 \text{ m h}^{-1}$). El dióxido de carbono se eliminó del biogás utilizando una trampa de NaOH 4 M tipo Mariotte, midiéndose posteriormente el metano con un gasómetro hidráulico. El esquema de la configuración experimental se presenta en la Figura 2.1. Las muestras se tomaron en la parte superior de los reactores, se filtraron y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

2.2.2 Fuente de biomasa

Los reactores se inocularon con 100 g SSV de una mezcla 1:1 de dos lodos granulares anaerobios diferentes. El primero de ellos se obtuvo de un reactor UASB a escala laboratorio que fue aclimatado al tratamiento de aguas residuales cosméticas durante 180 d. El tamaño de los gránulos de este lodo era de 1 mm, y su SMA de $0,73 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$. El segundo se obtuvo de un reactor UASB a escala industrial que trataba aguas residuales provenientes de una industria de reciclado de papel (Eerbeek, Países Bajos). Los gránulos tenían un diámetro de 1,5-2 mm y su SMA era de $0,46 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$.

2.2.3 Preparación del agua residual

El 24DCP (Sigma-Aldrich SA) se disolvió en NaOH 0,1 M hasta una concentración de 5 g 24DCP L^{-1} . El medio basal se preparó mediante la adición de macro y micronutrientes. Se añadieron como macronutrientes los siguientes compuestos (mg L^{-1}): NH_4Cl_2 (240), K_2HPO_4 (250), KH_2PO_4 (408), $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10). Además, se añadieron

micronutrientes en las cantidades siguientes ($\mu\text{g L}^{-1}$): $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2000), H_3BO_3 (50), ZnCl_2 (50), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (38), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (500), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (50), $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (90), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2000), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (92), $\text{Na}_2\text{SeO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (164), EDTA (1000), Resazurina (200), además de una fuente de acidez de H_2SO_4 96% (40) para facilitar la disolución de las sales (Sanz et al., 1997). El medio mineral base se suplementó con 24DCP y glucosa como fuente de carbono principal. Se añadió bicarbonato sódico a razón de $1 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}$ como fuente de alcalinidad y para mantener el pH en el intervalo 7,0-7,5. El agua sintética fue burbujeada con una mezcla 80:20 de $\text{N}_2:\text{CO}_2$ para eliminar el oxígeno residual, y se almacenó a 4°C para evitar procesos de fermentación.

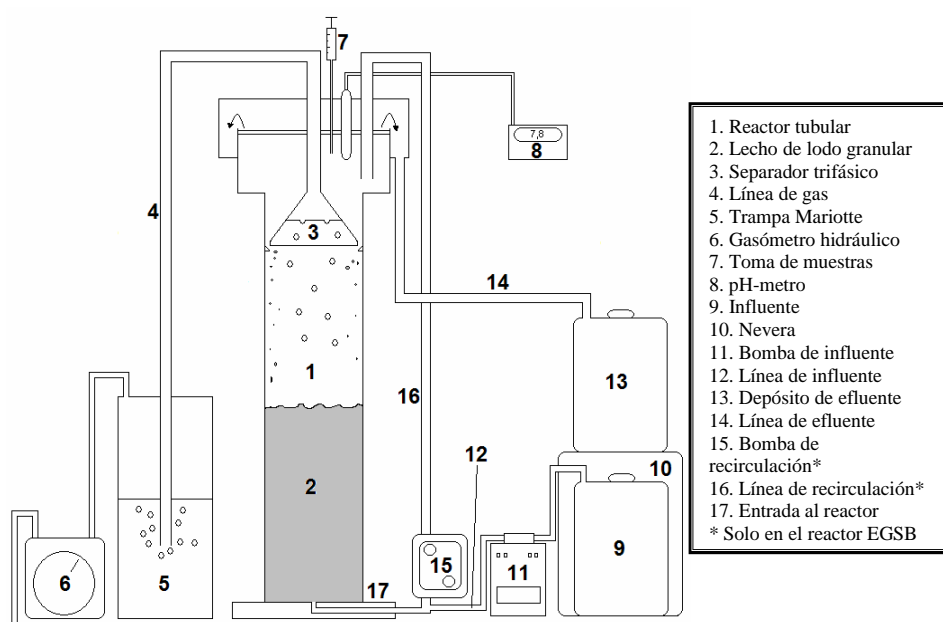


Figura 2.1: Diseño experimental de los reactores UASB y EGSB.

2.2.4 Pruebas SMA y ensayos en discontinuo

La medida de la SMA se realizó mediante el método de desplazamiento descrito por James et al. (1990). Los valores de SMA se estimaron ajustando los datos de producción de metano a un pseudo-primer orden (Modelo de Roediger, Ecuación 1.15). Con el objetivo de

evaluar el efecto de la glucosa en la dechloración anaerobia del 24DCP se realizaron varios ensayos en discontinuo utilizando botellas de suero de 250 mL inoculadas con 1,5 g SSV L⁻¹ de lodo granular adaptado a 24DCP obtenido del reactor EGSB al final del experimento. El metano se midió mediante el método de desplazamiento previamente mencionado. Se utilizó glucosa como fuente de carbono con una concentración de 4 g L⁻¹ y se añadió 24DCP en un intervalo de concentraciones 0-250 mg L⁻¹. Los ensayos se realizaron por duplicado y se mantuvieron hasta el agotamiento de la glucosa.

2.2.5 Experimentos en continuo

Se utilizó un t_{HR} de 48 h en ambos reactores. Los reactores se arrancaron con una concentración de glucosa equivalente a 8 g DQO L⁻¹ y 10 mg 24DCP L⁻¹ para aclimatar la biomasa a este compuesto. Se consideró que se había alcanzado el estado estacionario para estas condiciones cuando los reactores alcanzaron eficiencias estables de consumo de DQO y 24DCP del 85 y 90%, respectivamente. En estas condiciones, la producción de metano fue de 0,15 L CH₄ g⁻¹ DQO consumida.

Los reactores UASB y EGSB se operaron de manera continua durante 180 d, variándose la VCO y la velocidad de carga de 24DCP a lo largo de este tiempo (Tabla 2.1). La velocidad de carga de 24DCP se redujo en los últimos 3 periodos con el objetivo de recuperar la actividad metanogénica. Para poder comparar rendimientos, ambos reactores se sometieron a las mismas condiciones de operación.

2.2.6 Métodos analíticos

El análisis de la DQO total y soluble, así como de los SST y SSV, se realizó de acuerdo al [APHA Standard Methods \(1992\)](#). Los clorofenoles se cuantificaron mediante HPLC/UV empleando una longitud de onda de 270 nm (Prostar, Varian). Se empleó como fase móvil CH₃OH:H₂O:HAc en relación volumétrica 50:49,975:0,025, y como fase estacionaria una columna C₁₈ de 250 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro (Varian Microsorb-MV 100-5 C₁₈) a una temperatura de 40 °C.

La glucosa se cuantificó mediante HPLC/IR (Prostar, Varian). Se utilizó una columna 67H de 300 mm de longitud y 6,5 mm de diámetro como fase estacionaria (Varian Metacarb 67H 300:6,5) y H₂SO₄ 0,025N como fase móvil. La temperatura de la columna fue de 65 °C.

Tabla 2.1: Condiciones de operación de los reactores UASB y EGSB.

Etap	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Duración (d)	20	8	8	9	28	30	50	17	6	15
Glucosa (g COD L⁻¹)	8	8	8	8	8	4	4	8	8	12
24DCP (mg L⁻¹)	10	20	50	85	115	130	210	110	55	55

2.2.7 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido permite la formación de la imagen a través de la amplificación electrónica de señales generadas al irradiar la superficie de la muestra con un haz muy estrecho de electrones. Esta irradiación hace que la muestra desprenda electrones de baja energía (electrones secundarios) que son recogidos sobre una placa cargada positivamente (ánodo). De este modo se produce una señal eléctrica y con ello la imagen ampliada de la muestra. Esta técnica resulta muy versátil para la visualización y análisis de las características superficiales y microestructurales de asociaciones microbianas.

Se analizaron mediante SEM muestras de gránulos procedentes de los reactores UASB, EGSB y del inóculo inicial con el objetivo de comparar su morfología y estructura. Los gránulos se fijaron con glutaraldehído (2,5%) durante 2 h y posteriormente se lavaron con una disolución de cacodilato sódico (0,2 M, pH = 7,1) durante 30 min. El lodo se deshidrató posteriormente mediante disoluciones de concentraciones crecientes de Etanol (entre 10 y 100%) durante 20 min en cada disolución (Alphenaar et al., 1994). En un intercambiador de alta presión Emitech K850 se intercambió, durante 10 min, el etanol presente por dióxido de carbono líquido y se calentó 20 min hasta alcanzar las condiciones del punto crítico del CO₂ (80 bar y 40 °C). En un Sputter Caoter SC502 se recubrieron las muestras con oro a 20 mA y 1 mbar durante 45 s en atmósfera de Ar y se observaron en un microscopio electrónico de barrido (Phillips XL30, Ámsterdam, Países Bajos).

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Experimentos en discontinuo

En la Figura 2.2 se muestra la evolución temporal del 24DCP y del consumo acumulado de glucosa para concentraciones de 50, 150 y 250 mg L⁻¹ de 24DCP. Como control se utilizó un ensayo con 150 mg L⁻¹ de 24DCP al que no se añadió glucosa. A partir de este ensayo se puede señalar que la biodegradación de 24DCP en ausencia de una fuente de carbono fácilmente asimilable, como la glucosa, es prácticamente despreciable. Además, en los ensayos con glucosa se observa una disminución de la velocidad de degradación de 24DCP cuando la glucosa se consume totalmente. Alguno de los compuestos de degradación de la glucosa (como el ácido láctico o el hidrógeno) es el dador de electrones para la dechloración reductiva del 24DCP, por lo que el consumo de glucosa afecta en gran medida a la biodegradación del 24DCP. Este hecho ha sido previamente descrito en la *orto*-dechloración del pentaclorofenol (Shen et al., 2005).

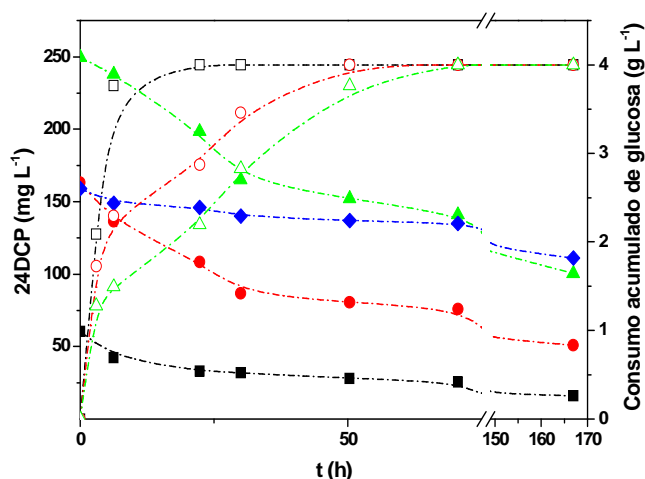


Figura 2.2: Evolución del 24DCP (símbolos rellenos) y de la glucosa (símbolos vacíos) en ensayos en discontinuo para concentraciones iniciales de 24DCP de 50 (■, □), 150 (●, ○) y 250 (▲, △) mg L⁻¹, respectivamente. Control sin glucosa con 150 mg 24DCP L⁻¹ (♦).

Por otra parte, se puede observar una disminución significativa en la velocidad de consumo de la glucosa según se aumenta la concentración del 24DCP, debido a la naturaleza tóxica de este compuesto. De cualquier forma, la glucosa se consume incluso a concentraciones de 24DCP relativamente elevadas, indicando que los microorganismos fermentativos solo están parcialmente inhibidos en el intervalo de concentraciones estudiado.

2.3.2 Experimentos en continuo

2.3.2.1 Reactor UASB

La Figura 2.3 recoge el comportamiento del reactor UASB. Durante los primeros 6 periodos este reactor funcionó con una elevada eficiencia de consumo de DQO y degradación de 24DCP. Los problemas de desestabilización comenzaron a partir del cuarto mes (periodo VII), cuando se registró un comportamiento inestable para una concentración en el influente de 210 mg 24DCP L⁻¹. Las eficiencias medias de degradación disminuyeron hasta el 60 y 75% para la eliminación de DQO y 24DCP, respectivamente. Debido a ello, la duración del periodo VII se extendió para evaluar si el reactor UASB podía adaptarse a estas condiciones extremas, lo cual no pudo lograrse, observando una progresiva disminución en la eficiencia de degradación de 24DCP. El impacto que representa la presencia de elevadas concentraciones de 24DCP en la actividad de los reactores UASB resulta más tóxico que idénticas concentraciones de 4CP ([Bajaj et al., 2008](#)). En los tres periodos finales, la velocidad de carga de 24DCP se redujo para intentar recuperar el rendimiento del sistema. Aunque la eficiencia de degradación del 24DCP se restableció hasta valores superiores al 80%, no ocurrió lo mismo con el rendimiento de consumo de DQO, que se mantuvo en valores sustancialmente menores que los obtenidos durante los tres primeros meses de operación estable (hasta el periodo VI). Este hecho sugiere la aparición de una inhibición irreversible en alguna de las etapas del catabolismo de la glucosa. En cualquier caso, el reactor UASB mostró una elevada eficiencia de eliminación de 24DCP. [Sponza y Ulükoy \(2005\)](#) obtuvieron eficiencias de degradación de 24DCP y DQO de 60% y 40%, respectivamente, trabajando con velocidades de carga comparables a las presentadas en este trabajo.

2.3.2.2 Reactor EGSB

Los resultados obtenidos en el reactor EGSB se presentan en la Figura 2.4. Tanto el consumo de DQO como la eficiencia de eliminación de 24DCP se mantuvieron por encima del 95% hasta el periodo VII en el cual, para una concentración de 24DCP en torno a 200 mg L⁻¹ en el influente, las eficiencias medias se redujeron al 74 y 84% de consumo de DQO y eliminación de 24DCP, respectivamente, lo que puede considerarse un rendimiento muy elevado en estas condiciones. Tras disminuir la concentración de 24DCP hasta 55 mg L⁻¹ el sistema se recuperó. De forma similar, [Collins et al. \(2005\)](#) describen que se puede recuperar plenamente un reactor EGSB inhibido por 246TCP si la concentración en el influente de 246TCP es reducida progresivamente hasta cero.

En general, el reactor EGSB mostró un mejor comportamiento que el UASB bajo similares condiciones de operación. Las eficiencias de biodegradación de DQO y de 24DCP se redujeron en ambos sistemas para una concentración inicial de 24DCP en torno a 210 mg L⁻¹, pero el efecto fue mucho más acusado en el reactor UASB y además no pudo recuperar su eficiencia en la degradación del cosustrato, mientras que el reactor EGSB recuperó su rendimiento inicial cuando la concentración de entrada de 24DCP se redujo hasta 55 mg L⁻¹.

2.3.2.3 Formación de 4CP

El 4CP resultó el principal intermedio de reacción en el tratamiento anaerobio de 24DCP. Su concentración aumentó gradualmente en ambos reactores hasta un valor en torno a 55 mg L⁻¹ en el periodo V (día 40), por lo que la eficiencia media de dechloración disminuyó desde un valor superior al 80% hasta menos del 30% (Figura 2.5). Con el fin de mejorar la dechloración del sistema, se redujo la carga de glucosa a la mitad al principio del periodo VI (día 73), para limitar la cantidad de receptores electrónicos de los microorganismos derivados de la fermentación de la glucosa, y obligarles a utilizar el enlace C-Cl de la posición *para* como receptor. Desde ese momento, la eficiencia de dechloración se mejoró progresivamente en ambos reactores hasta valores en torno al 60%, aunque en el reactor UASB la eficiencia cayó bruscamente debido a un descenso importante en la degradación del 24DCP (Figura 2.3a).

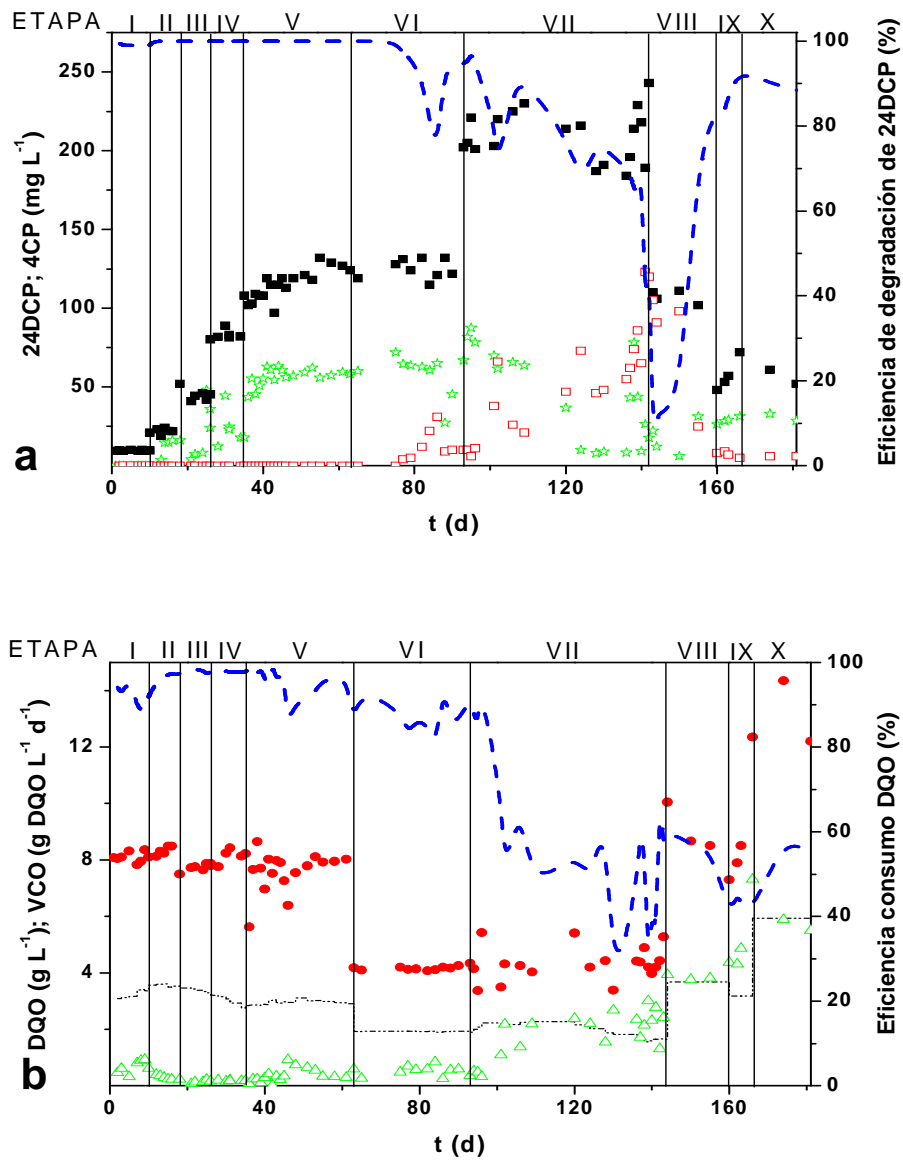


Figura 2.3: Comportamiento del reactor UASB. (a) Concentración de 24DCP en la entrada (■) y salida (□), concentración de 4CP en la salida (★) y eficiencia de degradación de 24DCP (línea azul discontinua). (b) Concentración de DQO en la entrada (●) y salida (△), velocidad de carga orgánica (línea negra discontinua) y eficiencia de consumo de DQO (línea azul discontinua).

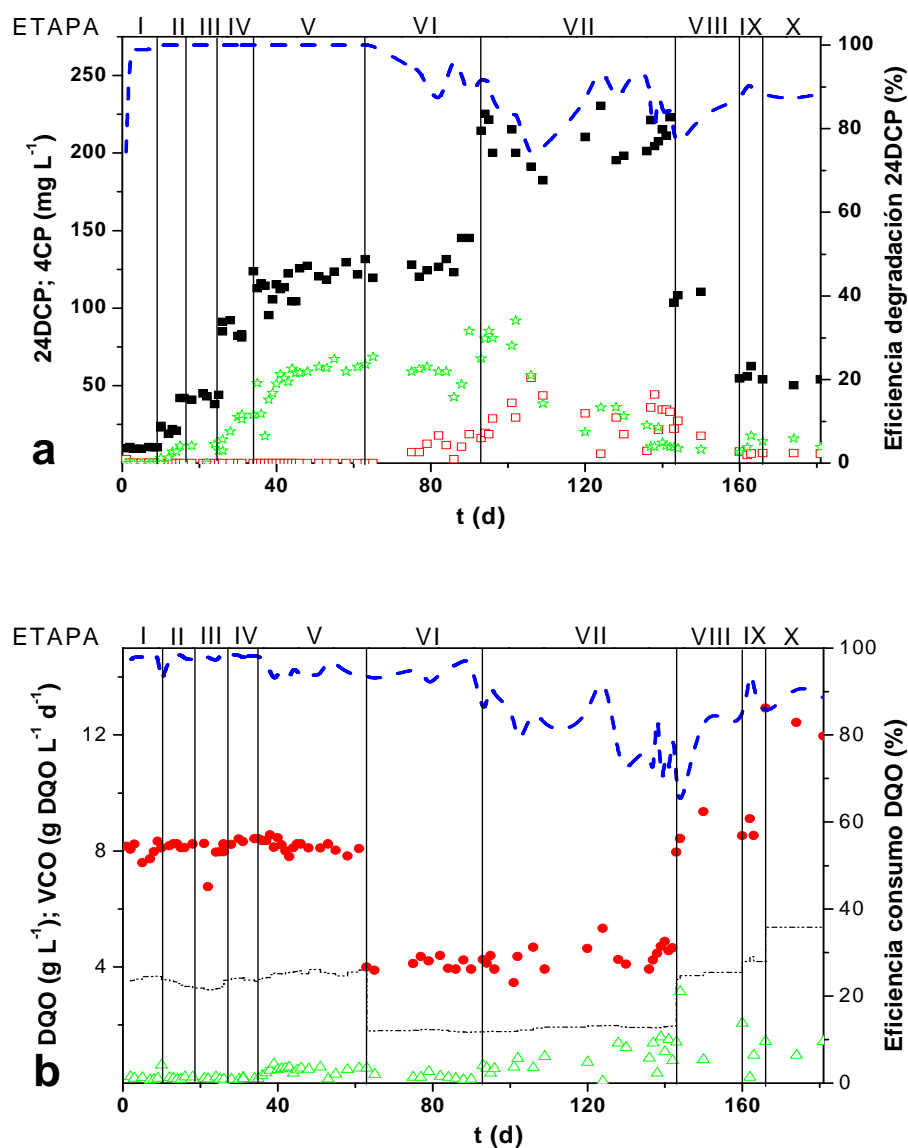


Figura 2.4: Comportamiento del reactor EGSB. (a) Concentración de 24DCP en la entrada (■) y salida (□), concentración de 4CP en la salida (★) y eficiencia de degradación de 24DCP (línea azul discontinua). (b) Concentración de DQO en la entrada (●) y salida (△), velocidad de carga orgánica (línea negra discontinua) y eficiencia de consumo de DQO (línea azul discontinua).

A pesar de ello, la concentración de salida de 4CP fue progresivamente disminuyendo en ambos reactores, confirmando que la concentración de la glucosa juega un papel clave en el proceso de *para*-decloración (Zhang y Wiegel, 1990). El aumento de la eficiencia de decloración unido a la disminución de la concentración de salida del 4CP implica necesariamente que los microorganismos necesitan una adaptación progresiva al 4CP procedente de la degradación de 24DCP, cuya concentración se aumentó gradualmente en la entrada al sistema. Trabajando con 24DCP, Sponza y Ulükoy (2008) concluyeron que la eficiencia de decloración varía de forma inversa a la VCO, aunque ellos optimizaron el proceso (casi el 100% de eficiencia) para VCO de 25-30 g DQO L⁻¹ d⁻¹, mientras que en nuestro caso se obtuvieron eficiencias similares suministrando VCO mucho menores (en torno a 2 g COD L⁻¹ d⁻¹, ver Figuras 2.3 y 2.4).

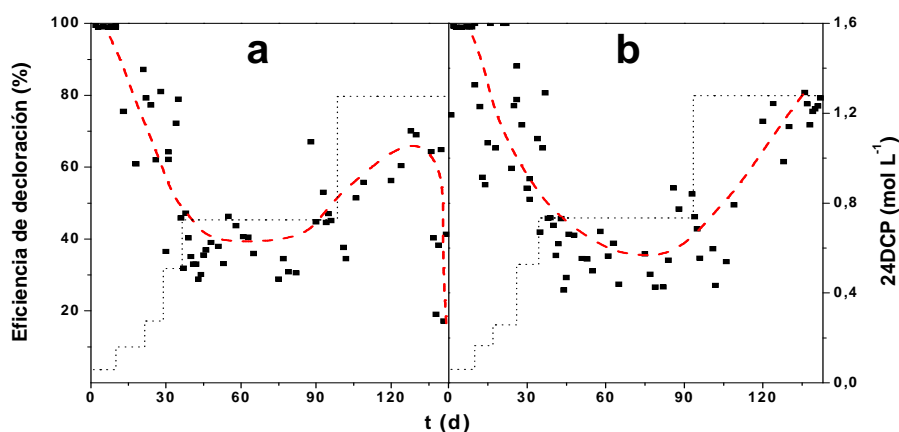


Figura 2.5: Evolución de la eficiencia de decloración (■) comparada con la concentración molar de 24DCP (línea negra discontinua) durante los primeros 156 días (etapas I-VII) en los reactores UASB (a) y EGSB (b). Tendencia (línea roja discontinua).

A pesar de la mejora en la biodegradación del 4CP, su concentración en ambos reactores se mantuvo siempre por encima de 20 mg L⁻¹ al final del periodo VII (día 140, Figuras 2.3a y 2.4a). Probablemente, un aumento en la duración de las etapas supondría la adaptación total de los microorganismos al 4CP, pero no siempre es posible aplicar un largo periodo de aclimatación debido a limitaciones técnicas y/o económicas. Tomando como base

que las técnicas aerobias permiten tratar aguas residuales industriales con bajas y altas cargas de monoclorofenoles (Buitron et al., 2005), una posible solución a este problema sería el acoplamiento de tecnologías anaerobias y aerobias en serie para poder tratar eficientemente aguas clorofenólicas complejas (Chen et al., 2003; Sponza y Ulükoy, 2005).

2.3.2.4 Producción de metano

El aumento en la concentración de 24DCP en el influente afectó de forma significativa la producción de metano en ambos reactores, reduciéndola sustancialmente. En cualquier caso, el rendimiento metanogénico de los reactores EGSB y UASB fue muy diferente, como se muestra en la Figura 2.6, en la que puede observarse la inhibición metanogénica en función de la velocidad de carga del 24DCP. Así, mientras en el reactor EGSB la actividad metanogénica se mantuvo en valores bastante elevados hasta una concentración de 24DCP en torno a 130 mg L⁻¹, en el reactor UASB esta actividad disminuyó progresivamente hasta su completa inhibición. Este sistema no recuperó su rendimiento hasta el último periodo, bajo condiciones más favorables (12 g DQO L⁻¹ y 55 mg 24DCP L⁻¹), logrando recuperar la actividad metanogénica hasta un valor próximo a 0,15 L CH₄ g⁻¹ de DQO consumida.

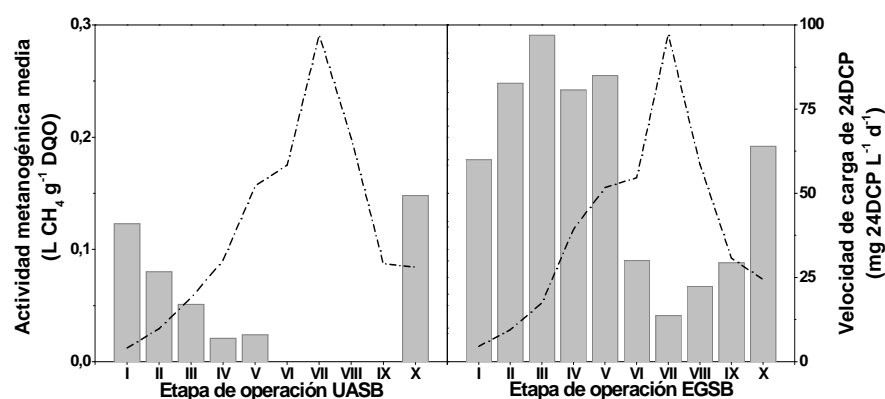


Figura 2.6: Actividad metanogénica media (barras) en los reactores UASB y EGSB en función de la velocidad de carga de 24DCP (línea discontinua).

En la Figura 2.7 se representa la eficiencia del consumo de DQO y la producción de metano en función de la velocidad de carga de 24DCP aplicada. Como puede observarse, la actividad metanogénica disminuyó simultáneamente con el aumento de velocidad de carga de 24DCP en ambos reactores pero, mientras en el reactor EGSB la inhibición metanogénica siguió una tendencia más o menos paralela a la inhibición de la DQO, la desviación fue mucho mayor en el reactor UASB, en el que la actividad metanogénica sufrió un deterioro significativamente mayor. Este hecho implica que los metanógenos están casi totalmente inhibidos en el reactor UASB, por lo que el resto de comunidades fermentativas pueden soportar mayores velocidades de carga de 24DCP. Esta deducción se puede explicar por el hecho de que los organismos metanogénicos se sitúan en posiciones más internas dentro de los gránulos anaerobios (Baloch et al., 2008). Al aplicar recirculación en el reactor EGSB, la concentración en la base del reactor disminuye, por lo que las bacterias de cloradoras pueden llevar a cabo la degradación del 24DCP antes de que este compuesto entre en contacto con los metanógenos.

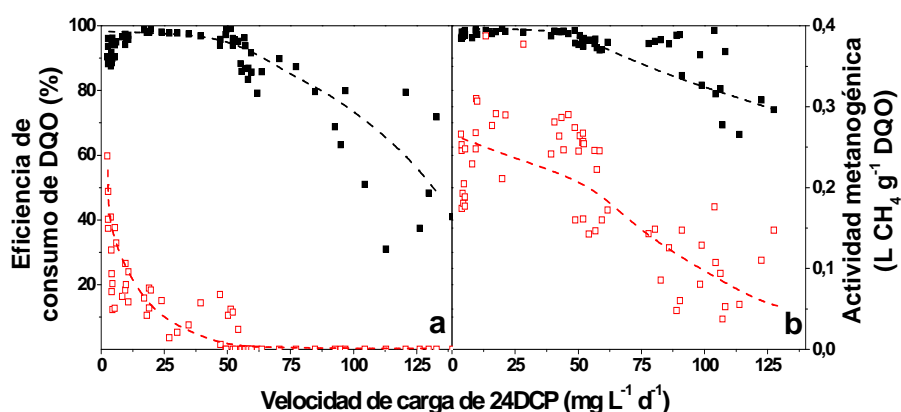


Figura 2.7: Eficiencia de consumo de DQO (■) y producción de metano (□) frente a la velocidad de carga de 24DCP en los reactores UASB (a) y EGSB (b). Tendencia (líneas discontinuas).

2.3.2.5 Estructura granular de los lodos UASB y EGSB

La estructura morfológica de los gránulos procedentes del inóculo inicial, así como las de los gránulos extraídos de los reactores UASB y EGSB al final del proceso continuo se recogen en la Figura 2.8 (a, b, c, respectivamente). En la parte izquierda de la figura, las micrografías muestran secciones de los gránulos. En ellas no se observan cambios físicos significativos, tales como desintegración o variaciones morfológicas o de tamaño. Además, la estratificación de las capas parece prácticamente similar en ambos reactores. En las micrografías de la parte derecha se presentan imágenes detalladas del interior de los gránulos, en las que se puede apreciar la inexistencia de oquedades o microfisuras causadas, entre otras razones, por la muerte de parte de los microorganismos presentes en el gránulo. Por tanto, no se pudieron establecer diferencias concluyentes que pudiesen relacionar el diferente comportamiento del lodo microbiano con posibles cambios morfológicos. A pesar de ello, la mayor proporción de microorganismos encontrada en los gránulos extraídos del reactor EGSB (96% SSV frente a 82% SSV en el reactor UASB) permiten explicar parcialmente la menor tolerancia al 24DCP mostrada por el sistema UASB.

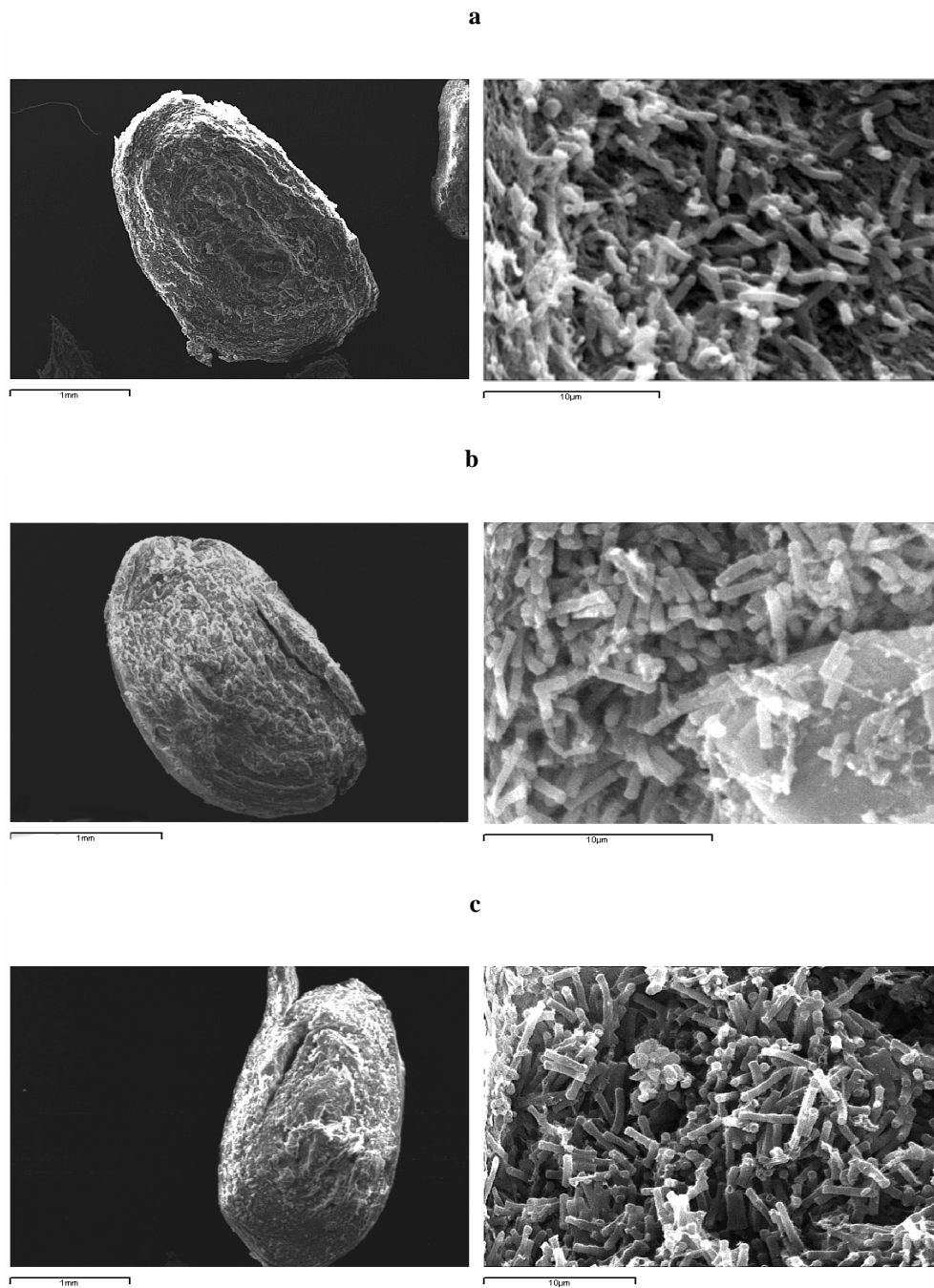


Figura 2.18: Micrografías SEM de gránulos del inóculo inicial (a) y procedentes de los reactores UASB (b) y EGSB (c). Estructura granular (izquierda) y detalle (derecha).

CAPÍTULO 3

BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA DE 24DCP EN DISCONTINUO



*Es preciso soñar, pero con la condición de creer en
nuestros sueños. De examinar con atención la vida real, de
confrontar nuestra observación con nuestros sueños, y de
realizar escrupulosamente nuestra fantasía.*

V. I. Lenin

Resumen:

Se ha estudiado la degradación de 24DCP en discontinuo utilizando lodo granular anaerobio extraído de un reactor EGSB adaptado a 24DCP. Se realizaron ensayos en botellas de reacción de 250 mL inoculadas con lodo granular a las que se les añadió macro y micronutrientes, fuente de alcalinidad, cosustrato (glucosa) y 24DCP a concentraciones entre 10 y 250 mg L⁻¹. Se trabajó con dos concentraciones de cosustrato, 4 y 25 g DQO L⁻¹ (baja y alta carga de glucosa). Los intermedios generados durante la degradación de la glucosa indican que la producción de metano se originó principalmente por vía hidrogenotrófica. Se calcularon las velocidades específicas inicial (V_i), media (V_m) y máxima (V_{max}) de degradación de 24DCP, el consumo de glucosa y la producción de metano para cada concentración de 24DCP ensayada. Respecto a la degradación de 24DCP, en los ensayos con ambas cargas de glucosa se detectó un proceso inhibitorio en la V_o de tipo Haldane, aunque la V_m aumentó para concentraciones crecientes de 24DCP. Por otro lado, tanto en el consumo de glucosa como en la metanogénesis hidrogenotrófica se observó una fuerte inhibición producida por 24DCP. Esta inhibición siguió un patrón acompetitivo, ya que disminuyó la V_{max} y se desplazó temporalmente. Finalmente, empleando el método de las velocidades iniciales, se ajustaron los valores de V_o de degradación del 24DCP a la Ecuación de Hill y las V_o de consumo de glucosa y producción de metano a sendos modelos de inhibición acompetitivos. Se obtuvieron valores de V_{max} , $S_{1/2}$ y n_H de 33 y 44 mg 24DCP d⁻¹ g⁻¹ SSV; 63 y 104 mg 24DCP L⁻¹; y 2,34 y 0,80, para los ensayos a baja y alta carga de glucosa, respectivamente, obteniendo ajustes estadísticamente correctos. Respecto a la inhibición del consumo de glucosa y de la metanogénesis, se obtuvo un orden de inhibición similar ($n \approx 2$, en ambos casos), mostrando un tipo de inhibición no selectiva, aunque la constante de inhibición estimada fue mayor en el caso de la metanogénesis que para la fermentación de la glucosa ($K_i = 0,030$ frente a 0,014 g 24DCP L⁻¹), lo que implica que los metanógenos hidrogenótrofos soportaron mejor el 24DCP que las bacterias fermentadoras de la glucosa.

3.1 Introducción

La biodegradación anaerobia de clorofenoles ha sido ampliamente estudiada desde la década de los 80. Es conocido que el número de sustituyentes clorados influye sobre la biodegradación de los clorofenoles (Mohn and Kennedy, 1992), que los monoclorofenoles son los productos de degradación más comunes (Susarla et al., 1996) y que uno de los aspectos clave en la dechloración anaerobia es el periodo de aclimatación, en la que se seleccionarán los microorganismos en función de la ruta de degradación energéticamente más favorable en términos de potencial redox (Takeuchi et al., 2000). Por ello, para obtener constantes cinéticas que permitan establecer los parámetros de diseño de reactores es necesario trabajar con biomasa aclimatada, en la cual las poblaciones microbianas están estabilizadas.

La dechloración anaerobia del 24DCP transcurre principalmente por vía *orto* (Atuanya y Chakrabarti, 2003), generando 4CP que, debido a su menor biodegradabilidad, suele acumularse en el medio (Bali y Sengül, 2003). La dechloración anaerobia es un proceso que necesita del aporte de donadores de electrones externos para poder realizarse (Holliger et al., 1998). Los azúcares han sido a menudo utilizados para este propósito debido a su bajo coste, alta solubilidad, neutralidad y elevada biodegradabilidad (pueden ser metabolizados por la mayoría de las bacterias). Los más comúnmente utilizados para la dechloración anaerobia son la sacarosa y la glucosa (Atuanya y Chakrabarti, 2003; Bali y Sengül, 2003; Mun et al., 2008a, 2008b). Aunque los azúcares en si mismos no funcionan como donadores de electrones en la dechloración reductiva, los productos derivados de las diferentes fermentaciones si poseen esta cualidad, sobre todo los ácidos orgánicos de 3 y 4 carbonos, el etanol, el formiato y el hidrógeno (Holliger et al., 1998).

Los modelos matemáticos se utilizan para determinar la relación entre los datos simulados y los resultados experimentales. Además, son útiles para establecer y optimizar parámetros de diseño de plantas a escala industrial (Sponza and Ulukoy, 2008). Por eso, funcionan como nexo entre los estudios de laboratorio y las aplicaciones industriales. Es recomendable la realización de experimentos en discontinuo cuando se proponen nuevos modelos cinéticos, ya que es posible fijar algunas variables. Es el caso de la concentración de

biomasa la cual, en condiciones anaerobias, se suele establecer como constante debido a su bajo crecimiento en comparación con el consumo de sustrato (Sahinkaya and Dilek, 2007). La mayoría de los modelos cinéticos aplicados a la decloración anaerobia se derivan de la ecuación de Michaelis-Menten, considerando los microorganismos como simples enzimas (Armenante et al., 1999). Así, los modelos cinéticos de Monod (Atuanya and Chakrabarti, 2004; Sponza and Uluköy, 2008) y Haldane (Sahinkaya and Dilek, 2007) han sido utilizados para explicar la decloración anaerobia del 24DCP, aunque en otros casos se han utilizados modelos de primer orden (Takeuchi et al., 2000). De todos ellos, sólo los modelos tipo Haldane son capaces de predecir procesos inhibición por sustrato (autoinhibición) ya que a elevadas concentraciones del tóxico ($> 65 \text{ mg 24DCP L}^{-1}$) las tasas de biodegradación son muy limitadas (Ning et al., 1997).

En este capítulo se estudia la degradación anaerobia de 24DCP mediante lodo granular aclimatado, utilizando glucosa como fuente principal de carbono y donador de electrones (cosustrato) para la decloración anaerobia del 24DCP. Además, se evalúa la cinética del proceso, prestando especial atención en la velocidad de consumo de glucosa y de la metanogénesis, a través de modelos inhibitorios acompetitivo y no competitivo, respectivamente.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Fuente de biomasa

Se utilizó lodo granular extraído del reactor EGSB que trató 24DCP descrito en el Capítulo 2, con un diámetro entre 1 y 2 mm y una SMA de 0,61 g CH₄-DQO g⁻¹ SSV d⁻¹.

3.2.2 Preparación del agua residual sintética

El 24DCP (Sigma-Aldrich) se disolvió en NaOH 0,1 M hasta una concentración de 5 g L⁻¹, tomándose alícuotas de esta disolución para preparar el agua residual sintética. Se empleó la misma fuente de macro y micronutrientes descrita en el Capítulo 2 de esta memoria. El medio mineral base se suplementó con 24DCP y glucosa como fuente de carbono principal. Se añadió bicarbonato sódico a razón de 1 g NaHCO₃ g⁻¹ DQO como fuente de alcalinidad y para mantener el pH en el intervalo 7,0-7,5. El agua sintética fue burbujeada con una mezcla 80:20 de N₂:CO₂ para eliminar el oxígeno residual.

3.2.3 Diseño experimental

En los ensayos de biodegradabilidad se emplearon botellas de 0,25 L de capacidad selladas herméticamente y provistas de una tapa con septum. Las botellas fueron inoculadas con una concentración de 1,5 g SSV L⁻¹ de lodo granular. El agua sintética se burbujeó con una mezcla de N₂:CO₂ 80:20 para desplazar el O₂ del espacio de cabeza y se añadieron 0,5 mL de una disolución de 50 g Na₂S·10H₂O L⁻¹ para eliminar el oxígeno disuelto. El metano fue cuantificado por el método de desplazamiento descrito por [James et al. \(1990\)](#). Se trabajó en una cámara termostatzada a 30 ± 1 °C. En la Tabla 3.1 se recoge el diseño experimental de los ensayos. Para facilitar la redacción de los resultados, se utiliza la siguiente nomenclatura: [Carga de glucosa][Carga de 24DCP (mg 24DCP L⁻¹)]. Se entendieron como baja y alta carga de glucosa (BC, AC) las concentraciones de 4 y 35 g glucosa-DQO L⁻¹, respectivamente. Los ensayos en blanco, es decir, sin 24DCP, se nombraron como B.

Tabla 3.1: Diseño experimental de los ensayos en discontinuo.

Ensayo	BCB	BC10	BC25	BC50	BC100	BC150	BC250	ACB	AC10	AC25	AC50	AC100	AC150	AC200
Biomasa (g SSV L ⁻¹)	1,46	1,44	1,48	1,51	1,49	1,45	1,49	1,49	1,53	1,62	1,52	1,61	1,55	1,56
Glucosa (g DQO L ⁻¹)				4,11							35			
24DCP (mg L ⁻¹)	0	10	25	50	100	150	250	0	10	25	50	100	150	250
Duración (d)				12							3,75			

3.2.4 Métodos experimentales y analíticos

Los SSV se midieron de acuerdo con el [APHA Standard Methods \(1992\)](#). La concentración de 24DCP y sus productos de degradación se cuantificaron por HPLC-VIS/UV utilizando el mismo método descrito en el Capítulo 2. La glucosa, los ácidos orgánicos y el etanol se cuantificaron mediante HPLC con detector de índice de refracción utilizando el mismo método descrito en el Capítulo 2.

El cálculo de la SMA se realizó siguiendo el procedimiento descrito por [James et al. \(1990\)](#). Los valores de SMA se estimaron mediante el modelo de Roediger (Ecuación 1.15; [Edeline, 1980](#)).

3.3 Resultados y discusión

Estos ensayos se realizaron con un doble objetivo. Por una parte se pretende estudiar la degradación biológica del 24DCP con el fin de obtener su velocidad de degradación. Por otra parte, se estudia la evolución de la concentración de glucosa y sus intermediarios metabólicos (AGV y alcoholes), con el fin de detectar las posibles etapas que son inhibidas por 24DCP y calcular la cinética de inhibición del consumo de glucosa y producción de metano en función de la concentración del tóxico. Asimismo, se pretende dilucidar si la concentración de glucosa es relevante en la cinética del proceso, para lo que se ensayaron dos concentraciones muy diferentes (4 y 35 g glucosa-DQO L⁻¹).

3.3.1 Degradación de glucosa y producción de metano

Respecto a la ruta degradativa de la glucosa, ésta parece depender de la concentración de 24DCP en el ensayo. En las Figuras 3.1 y 3.2 se muestra la evolución de los principales productos de degradación de la glucosa en los ensayos a bajas y altas cargas de glucosa, respectivamente. En todos los casos la glucosa fue completamente consumida y apareció, en primer lugar, ácido láctico como intermedio de degradación, compuesto producido en la fermentación láctica o ácido-mixta, que suele ser habitual en ensayos de biodegradación anaerobia de glucosa (Pascal y Pichinoty, 1964). En los ensayos a altas cargas de glucosa, la concentración del ácido láctico sólo es relevante en los ensayos AC150 y AC200. Posteriormente apareció ácido acético, sustrato principal para las bacterias metanogénicas acetotróficas. Asimismo, se produjo ácido propiónico y etanol, siendo éste último metabolito mayoritario al final del proceso.

Observando los resultados obtenidos utilizando una baja carga de glucosa, en los ensayos BC10 y BC25 los perfiles de concentraciones de todos los compuestos intermedios antes mencionados fueron muy similares al ensayo BCB, lo que indica la ausencia de inhibición por 24DCP en cualquiera de las etapas del catabolismo de la glucosa (Figura 3.1). Además, cabe mencionar la aparición en estos ensayos de glicerol como intermedio de reacción a concentraciones de 24DCP inferiores a 25 mg L⁻¹.

A partir del ensayo BC50 aparecen las primeras diferencias apreciables. Por una parte, la producción de metano disminuye considerablemente. Además, aunque el ácido láctico aparece en cantidades similares a como lo hace en los ensayos a concentraciones más bajas, es eliminado algo más lentamente. En los ensayos BC150 y BC250, la cantidad de ácido acético y propiónico generada es ligeramente inferior que en los ensayos anteriores.

En los ensayos con alta carga de glucosa se observó un periodo de latencia en el que no aparecieron intermedios de degradación de la glucosa ni hubo producción de metano. Este periodo se debe a la adaptación de los microorganismos a unas condiciones a la que no habían sido sometidos con anterioridad en los reactores continuos (cargas orgánicas mucho más elevadas y régimen de funcionamiento diferente) y resultó más prolongado en los ensayos AC100, AC150 y AC200 (Figura 3.2).

En este caso, el intermediario que aparece en mayor concentración en la degradación de glucosa es el etanol. Además, como diferencia destacable respecto a los ensayos con baja carga de glucosa, aparece en elevada concentración ácido fórmico. Ambos productos indican que la fermentación de la glucosa sigue rutas metabólicas distintas. También aparecen en concentración significativa los ácidos acético, propiónico y láctico. La concentración de estos compuestos es similar en los ensayos AC10, AC25, AC50 y AC100. A partir 150 mg 24DCP L⁻¹, comienza a acumularse el ácido láctico en el medio, al tiempo que desaparece el etanol.

La producción de metano fue parcialmente inhibida, sobre todo en el ensayo AC200, en el que la producción total fue casi un 40% inferior que en el ensayo ACB (blanco). El hecho de que en los ensayos AC100 y AC150 se genere mayor cantidad de metano que en ensayos con concentraciones de 24DCP menores responde a algún error en el muestreo (*licking* o pérdida de gas en los reactores), por lo que no será tenido en cuenta a la hora de realizar cálculos cinéticos.

Por otra parte, hay que señalar que, aunque la glucosa se consume casi en su totalidad en todos los ensayos, con una reducción superior al 95% en 90 h, los perfiles de concentraciones indican una inhibición parcial de las bacterias fermentadoras, ya que la velocidad de degradación disminuye en función de la concentración de 24DCP.

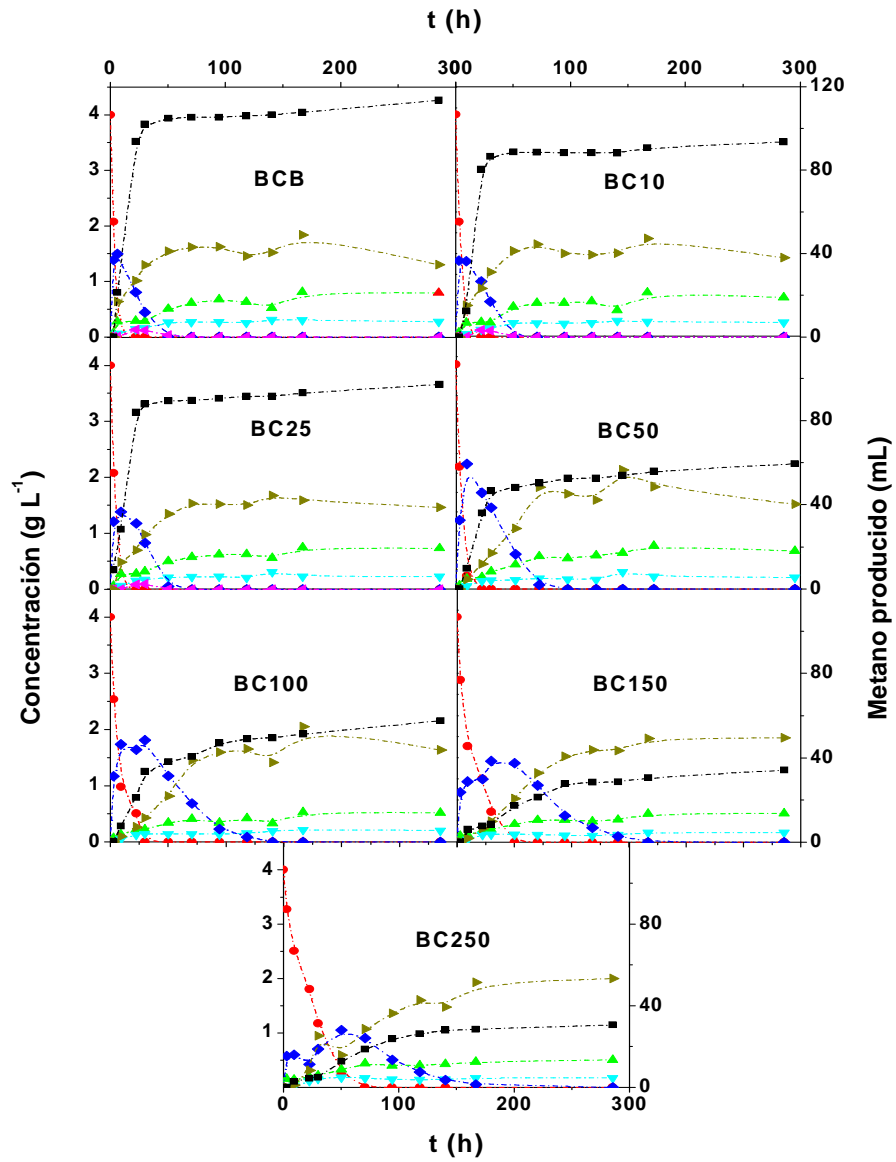


Figura 3.1: Evolución de la glucosa (●), de sus derivados metabólicos (acetato, ▲; propionato, ▼; lactato, ◆; etanol, ►; glicerol, ◆) y producción de metano (■) para los ensayos en discontinuo con baja carga de glucosa.

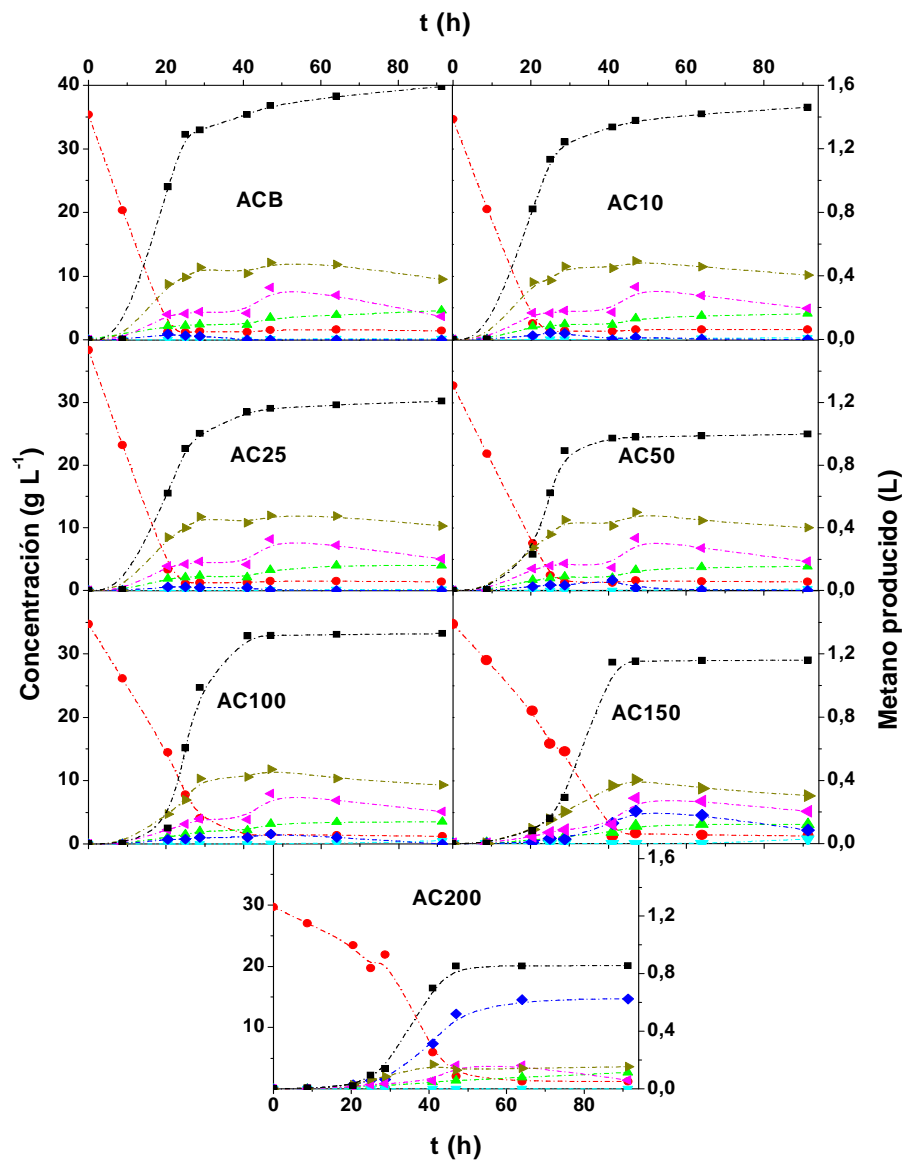


Figura 3.2: Evolución de la glucosa (●), de sus derivados metabólicos (acetato, ▲; propionato, ▼; lactato, ◆; etanol, ►; formiato, ◆) y producción de metano (■) para los ensayos discontinuos con alta carga de glucosa.

3.3.2 Ruta metabólica de los procesos fermentativos de la glucosa

La diferente concentración de glucosa empleada en los ensayos activa distintas rutas metabólicas de los microorganismos anaerobios presentes en los gránulos. En particular hay que destacar la elevada producción de etanol y ácido láctico en todos los ensayos (Figura 3.1), productos derivados de la fermentación heteroláctica de la glucosa, por vía fosfocetolasa. En cambio, en los ensayos con alta carga de glucosa, aparece también ácido fórmico (Figura 3.2), el cual debe proceder de la ruta ácido-mixta la cual, vía glicólisis, genera también etanol, ácido acético y láctico. El ácido fórmico se libera en las conversiones del piruvato y en el Acetil-CoA, que es el compuesto del que derivan después el acetato y el etanol (Castillo y Roldán, 2005). Por otra parte, el hecho de que aparezca ácido propiónico indica un tipo de fermentación propiónica, bien sea por la vía del acrilato o por la vía succinato-propionato. En ambos casos los productos finales son ácido propiónico, ácido acético y dióxido de carbono (Parés y Juárez, 1997). El ácido propiónico, finalmente, es transformado a etanol, que posteriormente se oxidará hasta acetato por la acción de las bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno obligadas (OHPA, sintrofobacterias). El esquema de las rutas metabólicas se presenta en la Figura 3.3.

El lactato y el propionato se transforman en acetato por acción de las bacterias acetogénicas. Se detectó un proceso inhibitorio de la acetogénesis del lactato en los ensayos a bajas y altas cargas de glucosa debido a la presencia del 24DCP ya que, al aumentar la concentración de este compuesto, la desaparición del lactato se prolongó en el tiempo, llegándose incluso a acumular a altas cargas de glucosa a concentraciones de 24DCP de 150 y 200 mg L⁻¹ (ver Figura 3.2). La degradación del resto de productos del metabolismo de la glucosa fue incompleta, por lo que se acumularon en el medio. De esta forma, no se pudo establecer una relación entre la concentración de 24DCP y la degradación de éstos compuestos. En cualquier caso, la reacción limitante, o “cuello de botella”, fue la oxidación de etanol a acetato. Esto demuestra una inhibición de las bacterias OHPA, que provocó una acumulación masiva de este alcohol que, en el caso de los ensayos a altas cargas de glucosa, llegó hasta concentraciones de 12 g L⁻¹ para concentraciones de 24DCP de 50 mg L⁻¹. Esta acumulación podría haber provocado, de manera secundaria, un efecto tóxico añadido. Kalyuzhny y Davlyatshina (1997), en un estudio sobre investigaciones cinéticas de la

producido. Esto implica que, aunque la metanogénesis hidrogenotrófica en este ensayo es mayoritaria, también se produce metano por acción de los metanógenos acetoclásticos. El hecho de que la metanogénesis hidrogenotrófica sucediese mayoritariamente en las primeras etapas del proceso fermentativo permite suponer que su inhibición fue provocada exclusivamente por la presencia del 24DCP, descartando de esta manera posibles procesos inhibitorios secundarios como la acumulación de etanol. Por otro lado, el aumento de las cantidades acumuladas de lactato y de etanol en el medio en función de la concentración de 24DCP indica que este compuesto inhibe sus oxidaciones, por lo que la cantidad de hidrógeno generada es menor y, por consiguiente, los metanógenos hidrogenótrofos disminuyen su actividad al disponer de menor cantidad de sustrato. Esto se traduce en una menor generación de metano, que en un principio podría relacionarse erróneamente con el efecto inhibitorio del 24DCP. En cualquier caso, es conocido que la metanogénesis acetoclástica es más sensible que la hidrogenotrófica, pues el rendimiento energético neto es muy inferior ($\Delta G = -28$ frente a $-139 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ CH}_4$).

Debido a la degradación parcial de los productos generados durante la fermentación de la glucosa y a la subsiguiente incompleta metanogénesis acetoclástica, el estudio posterior sobre la cinética inhibitoria se centró en la degradación de la glucosa y la metanogénesis hidrogenotrófica.

3.3.3 Biodegradación de 24DCP

En las Figuras 3.4a y 3.4b se recoge la evolución del 24DCP en los ensayos a baja y alta carga de glucosa, respectivamente. Los ensayos se mantuvieron el tiempo suficiente para poder determinar la velocidad inicial del proceso y, con ello, poder ajustar los datos a un modelo cinético. Puede observarse en ambos ensayos que el proceso de degradación del 24DCP coincidió temporalmente con el consumo de glucosa y la aparición de los AGV (ver Figuras 3.1 y 3.2), que como se ha visto anteriormente conllevaron la generación de hidrógeno, por lo que podría deducirse que este cosustrato (H_2) fue el que mayoritariamente utilizaron las bacterias para realizar la decloración reductiva del 24DCP.

Las conversiones de 24DCP alcanzadas en los ensayos con baja carga de glucosa fueron muy similares en todos los ensayos, disminuyendo ligeramente desde el 70 al 60% al

aumentar la concentración de 24DCP desde 10 a 250 mg L⁻¹ (Tabla 3.2). A pesar de ello, la cantidad de 24DCP consumida aumentó de forma lineal en función de la concentración de 24DCP inicial (Figura 3.5a), lo que implica que no se ha llegado al límite de concentración consumible por los microorganismos.

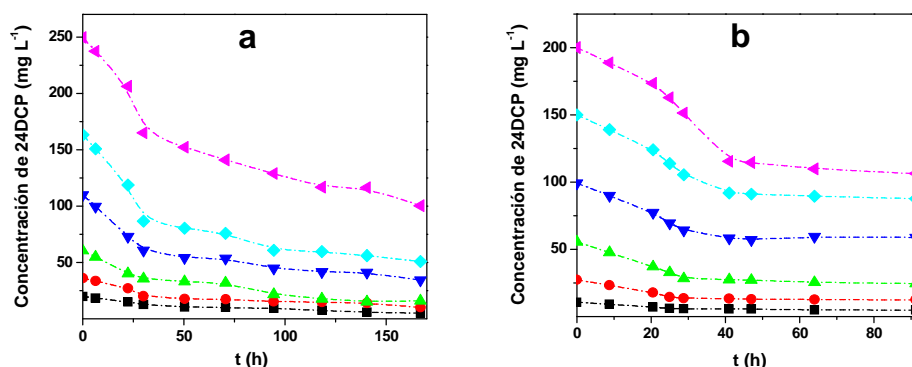


Figura 3.4: Evolución en la concentración de 24DCP en los ensayos con baja (a) y alta (b) carga de glucosa en 170 y 92 h, respectivamente, para concentraciones iniciales de 10 (■), 25 (●), 50 (▲), 100 (▼), 150 (◆) y 200 o 250 (◀) mg 24DCP L⁻¹.

En los ensayos con alta carga de glucosa la degradación de 24DCP sucedió a mayor velocidad durante las primeras 40 h de los mismos, mientras que en los ensayos a baja carga fue durante las primeras 30 h. Esto implica que existió un factor condicionante del proceso durante ese tiempo. El proceso de bioadsorción no fue relevante debido a que el consumo total de 24DCP aumentó de forma lineal a la carga inicial de 24DCP (Figura 3.5b), no detectando ninguna isoterma adsorptiva. Además, en ensayos previos se comprobó que, en ausencia de cosustrato, la degradación de 24DCP fue inexistente (Véase Figura 3.2). Por otra parte, la degradación del 24DCP coincidió temporalmente con la fermentación de la glucosa y la consecuente producción de AGV. Como se vio con anterioridad, en estas primeras etapas la generación de H₂ es importante, lo que pudo influir en la mayor degradación del 24DCP detectada en ese tiempo, dado que la dechloración reductiva de 24DCP requiere H₂. Los valores máximos de porcentaje de eliminación de 24DCP (55,7%) se alcanzaron en el ensayo AC50.

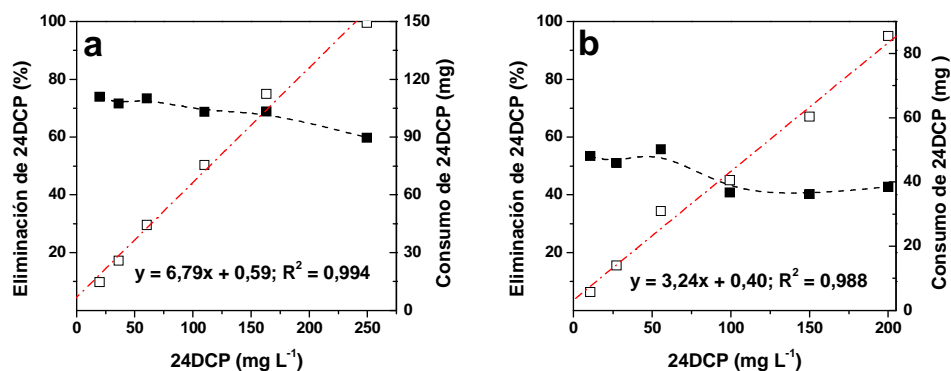


Figura 3.5: Relación entre el porcentaje de degradación (-■-) y el consumo (□; ajuste lineal —) con la concentración de 24DCP en los ensayos en discontinuo con baja (a) y alta (b) carga de glucosa (en 170 y 90 h, respectivamente).

En todos los ensayos aparecieron concentraciones traza de 4CP, 2CP y fenol a diferentes tiempos (datos no mostrados). Esto indica que se produjo efectivamente degradación de 24DCP, aunque fue el paso limitante, por lo que los intermedios de reacción no se acumularon. Esto puede deberse a dos razones. Por una parte, las velocidades de degradación de estos intermedios pudieron ser superiores, lo cual no parece muy lógico teniendo en cuenta que el 4CP, principal producto de degradación de la dechloración anaerobia del 24DCP (Zhang y Wiegel, 1990), es menos biodegradable que el 24DCP (Mohn y Kennedy, 1992). Por otro lado, los intermedios de degradación pudieron haberse generado en el interior de las bacterias y, debido a la interrupción de los ciclos metabólicos y de transporte intermembranales, haberse acumulado. Estos efectos sobre el transporte han sido demostrados previamente en estudios referentes al tipo de toxicidad e inhibición que generan los compuestos aromáticos clorados sobre la pared y las membranas bacterianas cuando se adhieren a ellas (Sikkema et al., 1995). Debido a la naturaleza reversible de este tipo de inhibición, cuando las bacterias recuperan su actividad, las bombas de transporte intermembranales se reactivan y, consecuentemente, los productos metabólicos no biodegradables son excretados al medio externo.

Por último, la relación entre el porcentaje de degradación y la concentración inicial de 24DCP (Figura 3.5) parece indicar que apenas existe inhibición en la eliminación de éste compuesto a largo plazo teniendo en cuenta valores de eliminación medios y en el intervalo de concentraciones estudiado. Esto es debido a que el lodo utilizado estaba adaptado a la degradación de 24DCP.

Tabla 3.2: Valores de consumo y porcentaje de degradación de 24DCP y glucosa (en 170 h) y producción de metano (en 290 h) para los ensayos en discontinuo con baja carga de glucosa y alta carga de glucosa (en 92 h).

Ensayo	24DCP		Glucosa		Metano
	Consumo (mg)	Eliminación (%)	Consumo (g DQO)	Reducción (%)	Producción (L)
BCB	-	-	1,22	100	0,114
BC10	1,47	73,9	1,20	100	0,094
BC25	2,58	71,5	1,19	100	0,096
BC50	4,44	73,4	1,20	100	0,059
BC100	7,56	68,7	1,23	100	0,057
BC150	11,22	68,8	1,17	100	0,034
BC250	14,91	59,8	1,21	100	0,031
ACB	-	-	8,82	95,9	1,426
AC10	1,31	53,4	8,66	95,6	1,352
AC25	3,41	51,0	9,60	96,4	1,139
AC50	7,14	55,7	8,19	95,8	0,979
AC100	10,00	40,8	7,50	96,5	1,319
AC150	15,65	40,2	8,68	96,5	1,165
AC200	22,11	42,7	8,68	96,6	0,872

3.3.4 Cálculo de los parámetros cinéticos

Los datos mostrados determinan que existe un cierto grado de inhibición en los procesos fermentativos y metanogénicos en presencia de 24DCP. Eker y Kargi (2006) observaron que la degradación de 24DCP implica una inhibición en el consumo de materia carbonácea, aunque sin el aporte de un cosustrato, la velocidad de degradación de 24DCP es muy inferior, por lo que es necesario establecer un equilibrio para maximizar el consumo de DQO y la eliminación de 24DCP. Para estudiar en profundidad el proceso inhibitorio registrado en los ensayos, se calcularon los parámetros cinéticos de la degradación de 24DCP, consumo de glucosa y producción de metano. En la Tabla 3.3 se recogen los resultados de los

parámetros cinéticos calculados a partir de los datos experimentales. Para obtener los datos de la velocidad inicial se calcularon las pendientes de un mínimo de tres de los primeros puntos en los que comenzó a existir degradación (de 24DCP o glucosa) o producción (de CH_4) por regresión lineal. La velocidad máxima se estimó como la máxima de las velocidades instantáneas para cada intervalo de tiempo, mientras que la velocidad media se calculó como la media ponderada de todas las velocidades instantáneas.

Al comparar los parámetros cinéticos de la degradación de 24DCP en los ensayos a baja y alta carga de glucosa se puede deducir que mientras que la velocidad específica inicial de eliminación de 24DCP es superior cuando existe baja carga de glucosa, la velocidad específica media es inferior. Esto indica que el aumento de la concentración de glucosa sólo mejora el rendimiento de eliminación de 24DCP en tiempos de reacción largos ya que las bacterias están dedicando más tiempo en fermentar la glucosa cuando ésta se encuentra en elevadas concentraciones, por lo que se puede intuir que la fuente de poder reductor necesaria para la dechloración anaerobia del 24DCP se obtiene en etapas tardías de la ruta metabólica de degradación de glucosa.

Otra consecuencia importante que se puede extraer de la Tabla 3.3 es que la velocidad específica máxima de eliminación de 24DCP en los ensayos a alta carga de glucosa aumenta según aumenta la concentración inicial de 24DCP, a diferencia de los ensayos a baja carga, en el que esta velocidad aumentó hasta un máximo de concentración (100 mg 24DCP L^{-1}) y después se redujo ligeramente. Esto parece indicar una mayor afinidad por el sustrato tóxico cuando existe mayor concentración de cosustrato carbonoso.

En la Figura 3.6 se muestran las velocidades específicas inicial, media y máxima de degradación de 24DCP. Se observó que con ambas cargas de glucosa, el perfil de las velocidades iniciales describe una curva logística, en la que la velocidad evoluciona potencialmente hasta un punto crítico en el que este aumento comienza a disminuir de manera asintótica. Este tipo de comportamientos se pueden describir mediante la ecuación de Hill. Por otra parte, para ambas cargas de glucosa la velocidad específica media aumentó linealmente con la concentración aplicada de 24DCP, lo cual sugiere que no se ha llegado al punto crítico de consumo de 24DCP, por lo que la capacidad degradativa del lodo utilizado es mayor que las cargas estudiadas. Este hecho es lógico teniendo en cuenta que el lodo estaba adaptado a 24DCP.

Tabla 3.3: Parámetros cinéticos calculados ($\text{mg 24DCP d}^{-1} \text{ g SSV}^{-1}$, $\text{g glucosa d}^{-1} \text{ g SSV}^{-1}$ y $\text{L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ g SSV}^{-1}$) para diferentes valores de concentración inicial de 24DCP.

Ensayo	24DCP (mg L^{-1})	24DCP			Glucosa			CH ₄		
		V_o	V_{max}	V_m	V_o	V_{max}	V_m	V_o	V_{max}	V_m
BCB	0,0	0,0	0,0	0,0	10,36	11,66	2,79	0,076	0,244	0,184
BC10	19,9	3,5	14	1,2	10,28	11,80	2,47	0,067	0,237	0,175
BC25	36,1	6,5	17,7	1,5	10,26	7,90	1,67	0,065	0,168	0,113
BC50	60,5	14,5	38,2	3,5	9,74	9,22	0,51	0,029	0,108	0,082
BC100	110,0	26,5	68,7	6,0	7,80	9,37	0,38	0,016	0,099	0,036
BC150	163,3	32,0	59,0	9,2	5,94	7,93	0,27	0,005	0,053	0,015
BC250	249,6	31,0	58,2	12,0	3,87	5,68	0,23	0,003	0,111	0,016
ACB	0,0	0,0	0,0	0,0	27,54	50,85	18,96	1,280	5,260	3,970
AC10	10,7	3,4	8,4	1,2	25,87	46,44	17,76	1,110	4,470	2,600
AC25	27,3	8,5	16,5	2,7	27,74	35,22	12,00	0,880	3,580	2,010
AC50	55,6	16,8	43,8	6,3	19,92	29,01	8,73	0,550	5,510	1,910
AC100	99,3	17,9	46,8	7,5	15,68	25,50	5,25	0,500	6,340	1,940
AC150	150,1	22,7	41,4	12,3	10,43	23,40	5,40	0,150	4,330	1,860
AC200	199,5	24,2	67,8	17,4	4,92	24,75	4,77	0,070	2,800	1,360

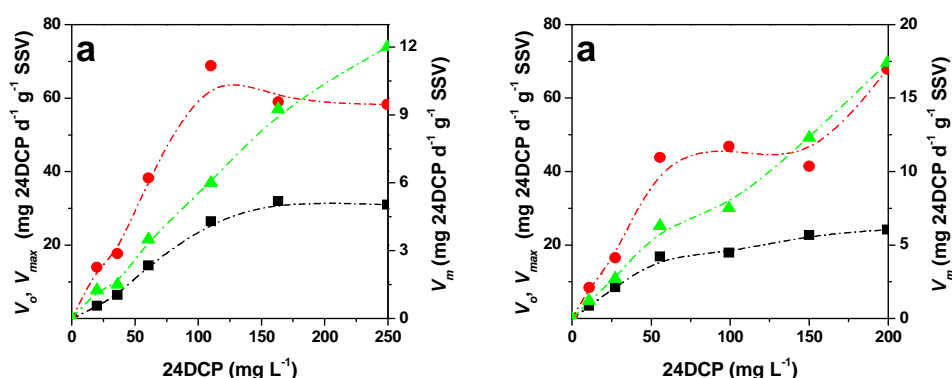


Figura 3.6: Representación de los valores de velocidades inicial (■), máxima (●) y media (▲) de degradación de 24DCP en los ensayos a baja (a) y alta (b) carga de glucosa.

Tanto las velocidades específicas iniciales de consumo de glucosa como las de producción de metano disminuyen exponencialmente con respecto a la concentración inicial

de 24DCP (Tabla 3.3), lo que indica un tipo de inhibición potencial. Por otra parte existió una relación lineal entre la velocidad media de degradación de glucosa y la velocidad media de producción de metano para concentraciones crecientes de 24DCP (Figura 3.7). Esto permite afirmar que, en el intervalo de concentraciones estudiado, la inhibición de la metanogénesis fue proporcional a la inhibición de la acidogénesis, de lo que se deduce que el mecanismo inhibitorio debe localizarse en zonas similares. En cambio, en los ensayos a alta carga de glucosa estas velocidades medias no tuvieron relación (Figura 3.7b), por lo que la inhibición de ambos procesos se llevó a cabo mediante mecanismos distintos.

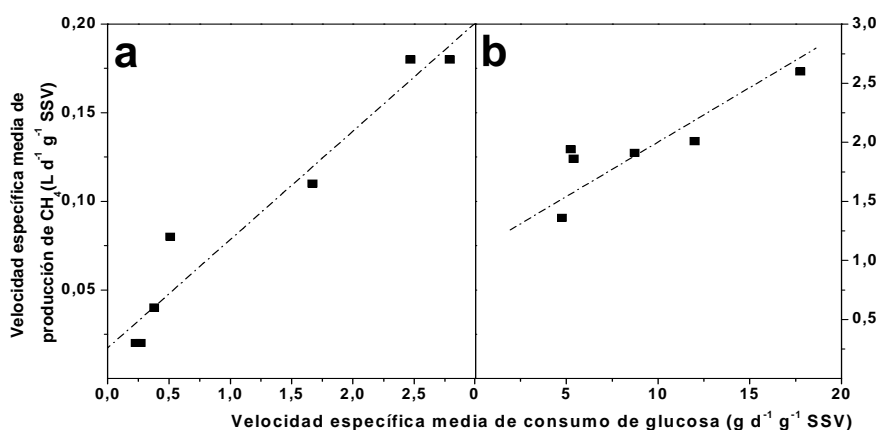


Figura 3.7: Relación entre la velocidad específica media de consumo de glucosa y la velocidad específica media de producción de metano en los ensayos a baja (a) y alta (b) carga de glucosa.

Además, estudiando los perfiles instantáneos de velocidad específica de consumo de glucosa y producción de metano (Figura 3.8), se puede observar como la velocidad máxima se desplaza tanto en el eje de ordenadas como en el eje de abscisas. Esto indica un tipo de inhibición acompetitiva, en la que se ve disminuida la velocidad máxima y la afinidad de los microorganismos por el sustrato (la velocidad máxima es desplazada en el tiempo). Este resultado está de acuerdo con el estudio de [Ning et al. \(1998\)](#), en el que se calcularon los parámetros cinéticos de la degradación de ácido acético en varios ensayos variando la

concentración de 24DCP. La degradación del ácido acético se ajustó a un modelo de inhibición acompetitiva con el 24DCP como inhibidor.

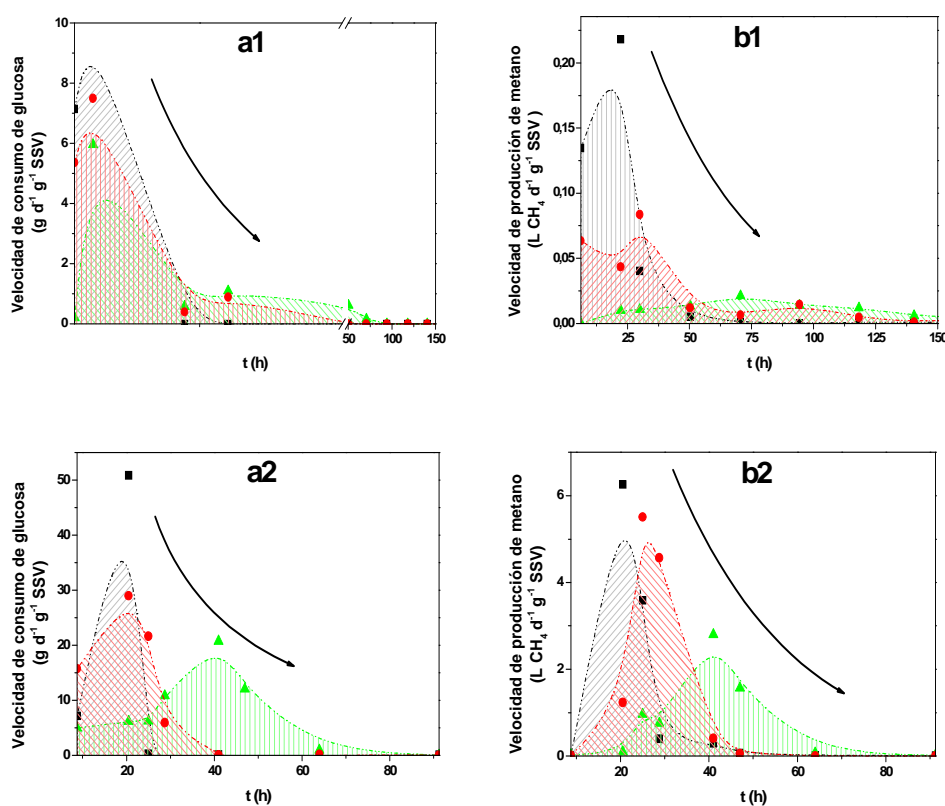


Figura 3.8: Velocidad instantánea de consumo de glucosa (a) y producción de metano (b) en los ensayos BCB, ACB (■), BC100, AC50 (●), BC250 y AC200 (▲) a (1) baja y (2) alta carga de glucosa, respectivamente.

3.3.5 Modelización cinética de los procesos inhibitorios

Todos los ajustes cinéticos que se describen a continuación se realizaron utilizando el programa informático Origin 7.0. Se utilizó el método de Levenberg-Marquardt (ajuste por mínimos cuadrados) para ajustar los datos a cada modelo, obteniendo curvas de simulación de

60 puntos con un intervalo de confianza del 95%. La bondad de ajuste a los modelos se determinó mediante el parámetro R^2 .

Como se ha deducido, el consumo de 24DCP sigue una cinética que se ajusta a la ecuación de Hill (véase Capítulo 1.4). Si se define la velocidad específica máxima de eliminación de 24DCP como $V_{max} = \mu_m Y_{XS}^{-1}$ (mg de 24DCP d⁻¹ g⁻¹ SSV) y se considera constante la concentración de microorganismos durante los ensayos, el modelo puede expresarse según la Ecuación 3.1.

$$V_s = X_o \cdot V_{max} \cdot \frac{S^{n_H}}{S_{1/2}^{n_H} + S^{n_H}} \quad [3.1]$$

Definiendo la velocidad específica V_{es} como ($V_s X_o^{-1}$) (mg de 24DCP d⁻¹ g⁻¹ SSV), se obtiene la Ecuación 3.2.

$$V_{es} = V_{max} \cdot \frac{S^{n_H}}{S_{1/2}^{n_H} + S^{n_H}} \quad [3.2]$$

Siguiendo el razonamiento de Michaelis-Menten, se aplicó la metodología de las velocidades iniciales. Para ello, se aplicó el modelo a los parámetros calculados de velocidad inicial específica de eliminación de 24DCP. En la Figura 3.9 se representa el ajuste de los datos experimentales de los procesos discontinuos con baja y alta carga de glucosa a la ecuación de Hill. Se observa que para concentraciones iniciales superiores a 100 mg L⁻¹ la curva tiende a ser asintótica.

Las constantes cinéticas estimadas se presentan en la Tabla 3.4. Se puede comprobar que tanto la V_{max} como la $S_{1/2}$ del proceso son parecidos para ambas cargas de glucosa (en torno a 33 y 27 mg 24DCP d⁻¹ g⁻¹ SSV; 63 y 47 mg 24DCP L⁻¹, para los ensayos a baja y alta carga de glucosa, respectivamente). En cambio, el número de Hill (n_H) estimado es muy diferente. A bajas concentraciones de glucosa, su valor es de 2,34, lo que implica que el proceso funciona bajo cooperatividad alostérica positiva. Este hecho permite afirmar que la unión del sustrato (el 24DCP) con los enzimas encargados de la decloración reductiva es más fácil a medida que estos enzimas se van saturando. En cambio, cuando existe elevada concentración de cosustrato en el medio (glucosa), el valor de la constante de Hill está muy próximo a 1, por lo que el proceso puede describirse mediante el modelo de Monod, en el cual

no existe interacción cooperativa entre el sustrato (24DCP) y los enzimas involucrados en la decloración reductiva.

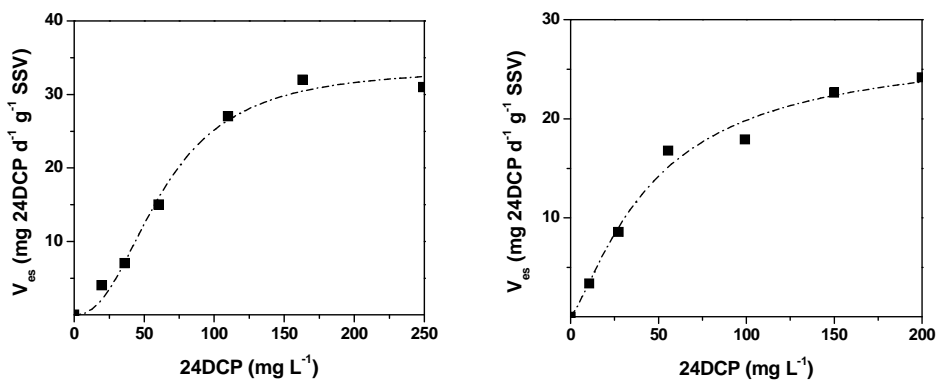


Figura 3.9: Ajuste de la velocidad específica inicial de degradación de 24DCP a la ecuación de Hill para los ensayos en discontinuo con baja (a) y alta (b) carga de glucosa.

Tabla 3.4: Valores de las constantes cinéticas resultantes de los ajustes de los ensayos con baja y alta carga de glucosa a la ecuación de Hill.

Carga de glucosa	V_{max} (mg 24DCP d ⁻¹ g ⁻¹ SSV)	$S_{1/2}$ (mg 24DCP L ⁻¹)	n_H (adimensional)	R^2
4 g DQO/L	33 ± 2	63 ± 6	2,34 ± 0,4	0,99
25 g DQO/L	27 ± 4	47 ± 15	1,29 ± 0,35	0,98

Generalmente, la cinética de degradación de 24DCP se ha estudiado según el modelo de Monod, pasando por alto posibles efectos inhibitorios o autoregulatorios que ofrecieron ajustes poco exactos estadísticamente. Así, [Atuanya y Chakrabarti \(2004\)](#) ajustaron los datos experimentales a este modelo obteniendo una bondad de ajuste razonable ($r = 0,766$), aunque sólo hasta concentraciones de 24DCP cercanas a 150 mg L⁻¹, ya que a partir de entonces detectaron un efecto inhibitorio que no pudo ajustar el modelo de Monod. En otros casos, la inhibición se hizo más evidente a partir de concentraciones superiores a 160 mg L⁻¹ ([Kargi y Eker, 2004](#)). En este último estudio, el valor de IC₅₀ obtenido (concentración de tóxico que inhibe la actividad del 50% de la microbiota) fue de 250 mg L⁻¹.

Por otra parte, como se ha visto anteriormente, la evolución en la velocidad específica inicial de consumo de glucosa y producción de metano indica una inhibición acompetitiva. En este tipo de inhibición disminuye la velocidad específica máxima, media e inicial de consumo de sustrato o formación de productos. Además, prolonga el periodo de latencia de los microorganismos al inhibir la síntesis de enzimas (Okpokwasili y Nweke, 2005)

Definiendo la velocidad específica máxima de consumo de glucosa como $V_{max} = \mu_m Y_{X/S}^{-1}$ (g glucosa d⁻¹ g⁻¹ SSV), y generalizando la ecuación que describe la inhibición enzimática acompetitiva (Ecuación 1.24) para una comunidad heterogénea de microorganismos, se obtiene la Ecuación 3.3.

$$v_s = \frac{V_{max} \cdot S \cdot X}{K_m + S + S \cdot \left(\frac{I}{K_i} \right)} \quad [3.3]$$

Donde S hace referencia a la concentración de sustrato consumida (g glucosa L⁻¹), mientras que I representa la concentración de inhibidor (mg 24DCP L⁻¹). Considerando constantes la cantidad de microorganismos y la concentración inicial de sustrato consumido, y definiendo la velocidad específica V_{es} como (V_s/X_o) (g glucosa d⁻¹ g⁻¹ SSV), se obtiene la Ecuación 3.4.

$$v_{es} = \frac{V_{max} \cdot S_o}{K_m + S_o + S_o \cdot \left(\frac{I}{K_i} \right)} \quad [3.4]$$

Para ofrecer más posibilidades en los ajustes cinéticos, a la Ecuación 3.4 se añadió la constante n , que realiza la misma función que el orden de inhibición en el modelo de Haldane, por lo que se puede denominar *orden de inhibición acompetitiva*. De esta forma se obtuvo la Ecuación 3.5.

$$v_{es} = \frac{V_{max} \cdot S_o}{K_m + S_o + S_o \cdot \left(\frac{I}{K_i} \right)^n} \quad [3.5]$$

Este modelo se puede llamar *inhibición acompetitiva de orden n*. Utilizando el método de las velocidades iniciales, se aplicó este modelo a los parámetros de velocidad específica inicial de consumo de glucosa de los ensayos con baja y alta carga de glucosa. En la Figura 3.10a se presentan los ajustes de los datos experimentales de consumo de glucosa a este modelo.

El modelo de Roediger para la producción de metano tiene en cuenta la producción de metano el todo el tiempo de digestión de la biomasa (Ecuación 1.15). En cambio, al tener en cuenta las primeras horas del proceso (método de las velocidades iniciales), la producción de metano de partida es nula, según viene definido en la Ecuación 3.6. Al asumir un primer orden, la velocidad de producción será máxima, ya que $k \cdot G_m = V_m$, obteniendo así la Ecuación 3.7.

$$V_s = k \cdot X \cdot (G_m - G_o) = k \cdot X \cdot G_m \quad [3.6]$$

$$V_s = X \cdot V_m \quad [3.7]$$

Razonando de igual forma que en el caso del consumo de glucosa, y asumiendo inhibición acompetitiva, en presencia de 24DCP la cinética de producción de metano puede seguir la Ecuación 3.8.

$$V_s = \frac{V_m \cdot X}{\left[1 + \left(\frac{I}{K_i}\right)^n\right]} \quad [3.8]$$

Si se considera constante la concentración de microorganismos, se puede definir la velocidad específica de producción de metano como $V_{es} = (V_s X_o^{-1})$ (L CH₄ d⁻¹ g⁻¹ SSV). De esta forma se obtiene la Ecuación 3.9.

$$V_{es} = \frac{V_m}{\left[1 + \left(\frac{I}{K_i}\right)^n\right]} \quad [3.9]$$

Este modelo puede llamarse *inhibición metanogénica de orden n*. Utilizando el método de las velocidades iniciales, se aplicó este modelo a los parámetros de velocidad

específica inicial de producción de metano de los ensayos con baja y alta carga de glucosa. En la Figura 3.10b se presentan los ajustes de los datos experimentales a este modelo.

En la Tabla 3.5 se presentan las constantes cinéticas estimadas de los ajustes tanto del consumo de glucosa como de producción de metano. La bondad de ajuste a los datos experimentales indica que las asunciones son empíricamente correctas. Se encontró que el orden de inhibición (n) fue ligeramente similar en el consumo de glucosa (1,89) y en la producción de metano (1,33), lo que sugiere una inhibición no selectiva del 24DCP.

Existen muy pocos estudios que traten sobre el efecto inhibitorio del 24DCP sobre la degradación de la glucosa. En el estudio de Ning et al. (1998) las conclusiones fueron similares, aunque las constantes no son comparables al tratarse de otro cosustrato (ácido acético). En otro estudio, se evaluó la inhibición en la degradación de la DQO de un agua residual con sustrato carbonoso sintético formado por varios compuestos orgánicos rápidamente biodegradables, desarrollando un modelo cinético en el que la concentración de 24DCP ejercía un efecto inhibitorio del tipo Haldane (Eker y Kargi, 2006).

La constante de inhibición obtenida para el consumo de glucosa fue superior a la propia en la metanogénesis (95 frente a 45 mg 24DCP L⁻¹, respectivamente), lo que determina que las bacterias fermentadoras de la glucosa soportan mayores concentraciones de tóxico que los metanógenos hidrogenótrofos, funcionando este proceso como limitante del resto de reacciones bioquímicas. La asunción de un modelo potencial de inhibición de la metanogénesis está de acuerdo con un estudio en el que se evaluó el grado de inhibición de la acetogénesis y metanogénesis en función de la concentración de varios tipos de mono, di y triclorofenoles (Kim et al., 1997).

Tabla 3.5: Valores de las constantes cinéticas obtenidas a partir del ajuste del consumo de glucosa y producción de metano a los modelos inhibitorios propuestos.*

Consumo de glucosa					Producción de metano				
K_s	K_i	V_m	n	R^2	K_i	V_m^{B*}	V_m^{A**}	n	R^2
9,32±1,23	95±8	34,67±1,72	1,89±0,25	0,98	45±6	0,077±0,040	1,269±0,060	1,33±0,17	0,98

* Unidades especificadas en texto. ** Velocidades máximas en los ensayos a baja y alta carga de glucosa.

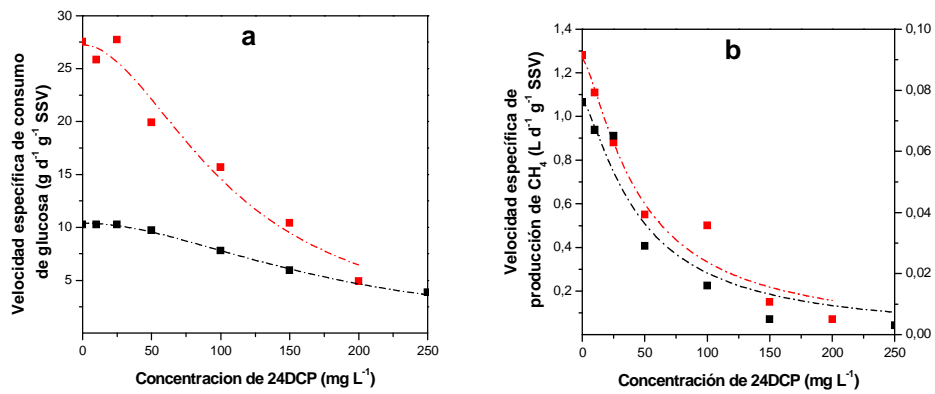


Figura 3.10: Ajuste de las velocidades iniciales de consumo de glucosa (a) y producción de metano (b) para los ensayos a baja (eje derecho, ■) y alta (eje izquierdo, ■) carga de glucosa.

CAPÍTULO 4

EFFECTO DE COSUSTRATOS EN LA DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE 246TCP.



Para un biólogo, la alternativa a pensar en términos evolutivos es no pensar en nada.

P. B. Medawar

Resumen

Se ha estudiado la influencia de varios cosustratos en la biodegradación anaerobia del 246TCP por lodo granular metanogénico, así como el modo en que este compuesto inhibe la metanogénesis. Se utilizaron los siguientes cosustratos: lactato, sacarosa, AGV (acetato, propionato y butirato en proporción molar 1:1:1), etanol, metanol y extracto de levadura (de 4 g DQO L⁻¹), así como formiato y metilamina (2 g DQO L⁻¹). Se ensayaron dos concentraciones de 246TCP (80 y 113 mg L⁻¹), correspondiendo esta última a la EC₅₀ para la metanogénesis acetotrófica. Se realizaron tres alimentaciones consecutivas, en las que se añadieron el cosustrato y los nutrientes. El 246TCP se añadió en la segunda alimentación. Este compuesto se degradó parcialmente en presencia de metilamina y formiato empleando ambas concentraciones iniciales. Los metabolitos acumulados en de la *orto*-decloración de 246TCP, bien 4CP (cuando se usaron etanol, metanol y AGV como cosustratos), o bien 24DCP (con lactato), impidieron la completa decloración de 246TCP. Se observó biodegradación parcial de monoclorofenoles intermedios (2CP y 4CP) en los ensayos con extracto de levadura, aunque en ellos también se registró una acumulación de diclorofenoles, tanto 24DCP como 26DCP. En presencia de sacarosa, se comprobó la degradación del 246TCP por la ruta *para*. Por otro lado, los metanógenos toleraron mejor la presencia de 246TCP cuando se emplearon metanol o etanol, lo que pudo comprobarse por la mayor actividad metanogénica específica estimada en los ensayos con estos cosustratos. Se estableció finalmente que una combinación entre etanol, sacarosa y extracto de levadura puede optimizar la degradación anaerobia de 246TCP.

4.1 Introducción

Los clorofenoles han sido extensivamente utilizados en la producción de pesticidas, herbicidas y tintes. Son tóxicos para muchos microorganismos, ya que pueden interrumpir el gradiente de protones entre membranas e interferir en la transducción energética celular (Chen et al., 2008). El 246TCP se utiliza principalmente como blanqueador de pulpa de papel y como preservante de madera (Perkins et al., 1994), pudiendo estar presente tanto en aguas residuales industriales como en aguas subterráneas contaminadas. Bajo condiciones anaerobias, el 246TCP sufre sucesivas decloraciones reductivas hasta su completa mineralización: $246\text{TCP} \rightarrow 24\text{DCP} + 26\text{DCP} \rightarrow 4\text{CP} + 2\text{CP} \rightarrow \text{Ph} \rightarrow \text{ácido benzoico} \rightarrow \text{HAc} \rightarrow \text{CH}_4$ (Kennedy et al., 1996). Este proceso necesita del aporte de un sustrato carbonoso fácilmente biodegradable que done electrones (codegradación) (Shen et al., 2005).

La ruta metabólica de la decloración reductiva parece ser diferente en función del cosustrato utilizado (Perkins et al., 1994; Sahinkaya et al., 2006). Así, existen cosustratos que claramente favorecen la *orto*-decloración de clorofenoles, como lactato (Magar et al., 1999), etanol (Collins et al., 2005) o acetato (Sun et al., 2000). Mediante la utilización de otros cosustratos, en cambio, no parece claro que se favorezca específicamente una vía metabólica, ya que ambas pueden estar presentes. Es el caso de los sustratos carbonosos complejos (Dietrick y Winter, 1990) o los azúcares (Duff et al., 1995). La decloración de monoclorofenoles mediante lodos anaerobios capaces de declorar fenoles policlorados es limitada (Nicholson et al., 1992). Además, el 4CP es el monoclorofenol más recalcitrante en condiciones anaerobias debido a que la decloración está menos favorecida en la posición *para* (Magar et al., 1999). Por estos motivos, la búsqueda de las condiciones necesarias para favorecer la decloración anaerobia de 4CP representa un desafío para poder lograr la completa decloración de policlorofenoles como el 246TCP.

Los clorofenoles no son sólo recalcitrantes sino que, además, inhiben la metanogénesis. El intervalo de concentraciones inhibitorias (expresadas como EC_{50}) varía habitualmente desde 2-8 mg L^{-1} para el PCP hasta 100-400 mg L^{-1} para los monoclorofenoles, por lo que la toxicidad parece depender del número de grupos cloruro presentes en el anillo

aromático. En cambio, se ha determinado que la inhibición metanogénica provocada por el 24DCP es mayor que la que causa el 246TCP (Patel et al., 1991; Wang et al., 1991).

En este capítulo se analiza la influencia de diversos cosustratos en la eficiencia de degradación de 246TCP y en su ruta metabólica en condiciones anaerobias. Además, se compara la inhibición metanogénica causada por el 246TCP con cada cosustrato empleado. Esta información será de gran ayuda en la selección del cosustrato adecuado para optimizar tanto la biodegradación del 246TCP como la metanogénesis cuando se traten aguas residuales que contengan este compuesto mediante tecnologías anaerobias.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Fuente de biomasa

El lodo granular utilizado en este estudio se obtuvo del reactor EGSB que trató 24DCP descrito en el Capítulo 3 de esta memoria. Este lodo presentaba un diámetro entre 1-2 mm y una SMA de $0,41 \text{ g CH}_4\text{-DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$.

4.2.2 Ensayos de adsorción/desorción

La adsorción del 246TCP en los gránulos se estudió en botellas de suero de 100 mL que contenían una solución tampón de fosfatos (PBS) para evitar la lisis celular, compuesta por $10,8 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, y $32,7 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua mili-Q ajustada a $\text{pH} = 7$. A esta disolución se le añadió $0,5 \text{ g SSV L}^{-1}$ de lodo granular autoclavado. Se emplearon concentraciones de 246TCP entre $25\text{-}250 \text{ mg L}^{-1}$. Los ensayos se realizaron a 30°C y la duración de los mismos fue de 4 d, lo que aseguraba que se había alcanzado el equilibrio de adsorción. La recuperación del 246TCP fue realizada mediante dos lavados sucesivos de los gránulos con PBS y un lavado final con PBS y acetonitrilo en una proporción 1:1 (v/v). La cantidad recuperada se calculó como suma de la cantidad recuperada en los tres lavados sucesivos. El error relativo estimado fue menor del 0,5% en todos los casos.

4.2.3 Ensayos de biodegradabilidad en ausencia de cosustrato

El estudio de biodegradabilidad de 246TCP se llevó a cabo en botellas de suero de 250 mL inoculadas con $1,5 \text{ g SSV L}^{-1}$ de lodo granular. Se utilizó el mismo medio salino descrito en el Capítulo 2 de esta memoria. Se añadió disolución tampón de bicarbonato a razón de 4 g L^{-1} como fuente de alcalinidad. Las condiciones de operación fueron $\text{pH} = 7$ y 30°C . Para asegurar condiciones anaerobias, el medio fue burbujeado durante 5 min con una mezcla de $\text{N}_2\text{:CO}_2$ 75:25 (v/v) y se le añadió 1 mL L^{-1} de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ en concentración de

100 g L⁻¹. Se emplearon concentraciones de 246TCP entre 10-80 mg L⁻¹ y los ensayos tuvieron una duración de 12 d.

4.2.4 Ensayos de inhibición

La inhibición metanogénica acetoclástica se determinó mediante ensayos en discontinuo en las mismas condiciones que los ensayos de biodegradabilidad. Se utilizó acetato a razón de 4 g DQO L⁻¹ en cada alimentación y se emplearon concentraciones de 246TCP entre 10-165 mg L⁻¹, el cual se añadió en una segunda alimentación de acetato. La duración de estos ensayos fue de 30 d.

4.2.5 Experimentos con diferentes cosustratos

Las condiciones de estos ensayos fueron las mismas que las descritas en los ensayos de biodegradabilidad. Se añadió bicarbonato, solución salina y el cosustrato en tres alimentaciones. La primera alimentación se realizó con el objetivo de activar el consorcio metanogénico. El 246TCP se incorporó al medio en la segunda alimentación en concentraciones de 80 y 113 mg L⁻¹. La tercera alimentación, a la que no se le añadió 246TCP, se realizó con el objetivo de determinar si los cosustratos realmente mejoraban la biodegradación del 246TCP. Se seleccionaron diferentes cosustratos tratando de cubrir todo el intervalo de dadores de electrones comúnmente empleados en condiciones anaerobias: carbohidratos (sacarosa, Sac), AGV (Ac:Pr:But en relación molar 1:1:1; formiato, For), otros ácidos orgánicos (lactato, Lac), alcoholes (etanol, Et; metanol, Met), aminas (metilamina, Mam) y sustratos complejos (extracto de levadura, EL). Todos los sustratos se añadieron en concentraciones de 4 g DQO L⁻¹ salvo el formiato y la metilamina, que se añadieron a razón de 2 g DQO L⁻¹ debido a su toxicidad. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Además, se acompañaron de blancos por triplicado a los que no se les añadió 246TCP. El experimento completo duró 80 días.

4.2.6 Métodos analíticos

El análisis de la DQO y de los SSV se realizó de acuerdo con el [APHA Standard Methods \(1992\)](#). El 246TCP y sus intermedios de reacción se cuantificaron mediante HPLC con detector VIS/UV fijado a 270 nm (Prostar, Varian). Se usó C₁₈ como fase estacionaria (Valco Microsorb-MW 250:4,6 C₁₈) y una mezcla de acetonitrilo, agua y ácido acético (60:39:1 en volumen) como fase móvil. La temperatura de la columna fue de 40 °C. El metano producido se cuantificó empleando el método de desplazamiento descrito por [James et al. \(1990\)](#). Los valores de SMA se estimaron mediante el modelo de Roediger ([Edeline, 1980](#)).

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Ensayos de adsorción/desorción

Los ensayos de adsorción se realizaron con el objetivo de cuantificar la posible adsorción del 246TCP en el gránulo. Estos experimentos mostraron que la adsorción no fue significativa en las condiciones de trabajo utilizadas, por lo que la disminución de la concentración del 246TCP en los ensayos bióticos puede atribuirse únicamente a la biodegradación.

4.3.2 Ensayos de biodegradabilidad

Los tests de biodegradabilidad se plantearon con el objetivo de cuantificar la actividad de cloración en ausencia de una fuente de carbono adicional y determinar si la bioadsorción sobre los gránulos es diferente con lodo no autoclavado. En la Figura 4.1 se muestra la evolución de la concentración de 246TCP en estos ensayos. Se observa que inicialmente la concentración de 246TCP sufre una ligera disminución, probablemente debida a la adsorción. Durante el resto del ensayo, la concentración de 246TCP apenas sufrió cambios significativos. Estos resultados indican que la biodegradación rápida y efectiva del 246TCP no es posible sin el empleo de una fuente externa de electrones, como ya ha sido descrito con anterioridad (Field y Sierra-Álvarez, 2008). Aunque se ha descrito que existe biodegradación de triclorofenoles en condiciones anaerobias sin fuente de carbono externa (Vallecillo et al., 1999), el tiempo requerido para su eliminación completa (varias semanas) convierte en inefectivo su tratamiento en reactores continuos.

4.3.3 Ensayos de inhibición

Se realizaron experimentos de inhibición para establecer los valores de concentración de 246TCP a emplear en los experimentos posteriores con diferentes cosustratos. Se eligió la metanogénesis acetoclástica por ser la etapa más sensible de la

digestión anaerobia y debido a que en torno a 2/3 del metano producido en un digestor anaerobio proviene de esta forma de metanogénesis. El grado de inhibición se evaluó a partir de la disminución de la velocidad inicial de producción de metano. En la Figura 4.2 se muestra la relación existente entre la velocidad inicial de producción de metano (o actividad metanogénica acetoclástica específica) y la concentración de 246TCP ensayada. La concentración de 246TCP que causó el 50% de inhibición de la actividad metanogénica acetotrófica (EC_{50}) estuvo en torno a 110-115 $mg L^{-1}$.

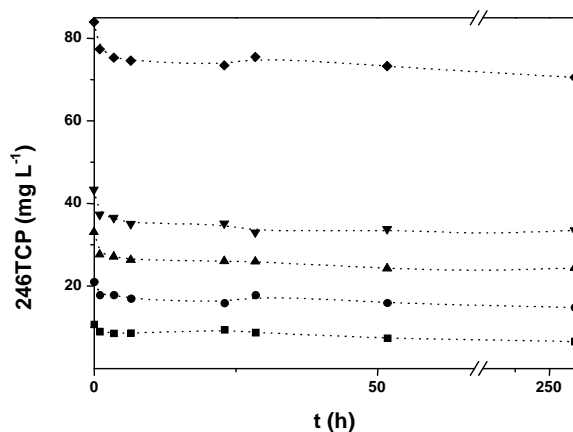


Figura 4.1: Evolución del 246TCP en los ensayos de biodegradabilidad. Concentraciones de 246TCP ensayadas: 10 (■), 20 (●), 30 (▲), 40 (▼), 80 (◆) $mg L^{-1}$.

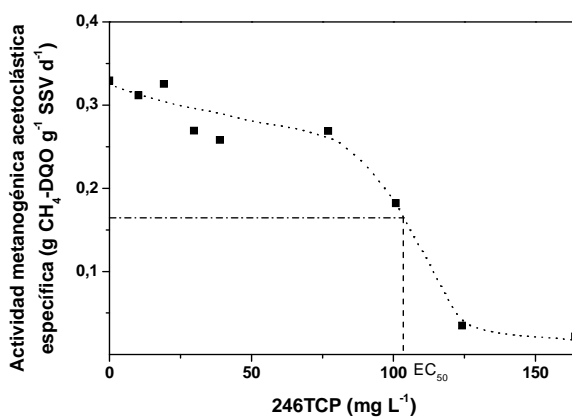


Figura 4.2: Relación entre la actividad metanogénica acetoclástica específica y la concentración de 246TCP.

4.3.4 Experimentos con diferentes cosustratos

La evolución del 246TCP y sus metabolitos secundarios más representativos se muestra en las Figuras 4.3 y 4.4 para los diferentes cosustratos utilizando concentraciones de 246TCP de 80 y 113 mg L⁻¹, respectivamente. La primera corresponde a una concentración que origina una ligera inhibición metanogénica acetoclástica y, la segunda, al valor de la EC₅₀. Las líneas verticales de las figuras mencionadas indican el momento de la tercera alimentación. La Tabla 4.1 muestra la eficiencia de biodegradación de 246TCP, los valores máximos de concentración (expresados como % molar respecto a la concentración inicial de 246TCP) de los metabolitos producidos durante el proceso biológico y si los metabolitos son productos finales o intermedios de reacción. El análisis de la inhibición metanogénica se muestra en la Tabla 4.2, en la que se recogen los valores de SMA obtenidos en las alimentaciones 2ª y 3ª, los cuales serán de utilidad en la evaluación de la persistencia de efectos inhibitorios dependiendo de los cosustratos utilizados y de las concentraciones de 246TCP.

4.3.4.1 Etanol

En las Figuras 4.3a y 4.4a se observa como la ruta metabólica de degradación del 246TCP condujo rápidamente a la formación del 4CP como producto de la *orto*-decloración. Este compuesto es difícilmente biodegradable en condiciones anaerobias, por lo que se acumuló en el medio de reacción. El etanol ha sido utilizado en procesos anaerobios de decloración (Collins et al., 2005). Puede ser oxidado por las bacterias OHPA y las bacterias reductoras del sulfato, algunas de las cuales pueden utilizar los compuestos policlorados como aceptores finales de electrones en lugar del sulfato (Villemur et al., 2006). Así, el acetato resultante de la oxidación del etanol es utilizado por los metanógenos acetótrofos en una relación sintrófica.

4.3.4.2 Extracto de levadura

Este cosustrato se seleccionó por su extensa utilización como componente de cultivos microbianos. En la Figura 4.3b se observa la aparición de 4CP en los momentos

iniciales del proceso que es declorado posteriormente para generar fenol, lo que sugiere un indicio de *para*-decloración. En cambio, en el ensayo realizado con 113 mg 246TCP L⁻¹ (Figura 4.4b) el 4CP fue el metabolito acumulado predominante, lo que indica que la decloración sucedió preferentemente en posición *orto* en lugar de *para*. Este resultado está de acuerdo con trabajos previos que utilizaron sustratos complejos como dadores de electrones (Dietrich y Winter, 1990). Parece claro que ambas vías metabólicas sucedieron porque aparecieron todos los intermedios de reacción posibles (Tabla 4.1). Por otro lado, se sugiere que la causa principal de la inhibición metanogénica detectada fue la acumulación de 4CP.

4.3.4.3 AGV

La decloración utilizando AGV como cosustrato ocurrió también predominantemente en la posición *orto*, siendo el 4CP el único metabolito acumulado. De hecho, existen evidencias bibliográficas que demuestran que los AGV pueden ser utilizados como dadores de electrones en la decloración reductiva de clorofenoles en posición *orto*. En este sentido, Sun et al. (2000) mostraron que la especie *Desulfovibrio dechloracetivorans* es capaz de declorar el 2CP (posición *orto*) utilizando únicamente acetato como fuente de electrones. También se conoce que los microorganismos oxidantes de propionato son capaces de declorar clorofenoles predominantemente en posición *orto* (Jin y Bhattacharya, 1997). A pesar de ello, la baja actividad decloradora que tiene lugar empleando la concentración de 246TCP correspondiente a la EC₅₀ (Figura 4.4c) unida a la reducida SMA (Tabla 4.2) limita la aplicabilidad de los AGV a un intervalo de concentración de 246TCP relativamente bajo.

4.3.4.4 Metilamina

En presencia de metilamina (sustrato directo de la metanogénesis) se observa que los metanógenos pueden ser capaces de efectuar la decloración en posición *orto*, ya que la degradación de 246TCP origina como intermedio de reacción 4CP durante la segunda alimentación (Figura 4.3d). Además, el elevado grado de inhibición metanogénica observado en la tercera alimentación tanto en los ensayos con 80 mg L⁻¹ como en los de 113 mg L⁻¹ de 246TCP (Tabla 4.1) es consistente con esta discusión porque en ausencia del proceso metanogénico la decloración apenas tuvo efecto (Figura 4.4d). Los electrones necesarios para

la decoloración en posición *orto* serían transferidos hasta los enlaces C-Cl a través de la cadena transportadora de electrones situada en el sistema heterodisulfuro reductasa/hidrogenasa de la metanogénesis metilotrófica. De esta forma, esta cadena transportadora distribuiría los electrones necesarios tanto para la biosíntesis de metano como para la decoloración reductiva. Este fenómeno ha sido observado previamente en arqueas del género *Methanosarcina* sp. en la deshalogenación de compuestos alifáticos (Fathepure y Boyd, 1988).

4.3.4.5 Sacarosa

La ruta metabólica de degradación con este cosustrato transcurrió por una vía diferente a la del resto de cosustratos. En este caso, la decoloración sucedió principalmente en posición *para*, como refleja la acumulación de 2CP y 26DCP (Figura 4.3e). Sin embargo, la formación y acumulación de 24DCP y 4CP prueba que también tuvo lugar la *orto*-decoloración (Tabla 4.1). Ambas vías de decoloración han sido descritas con anterioridad en la bibliografía utilizando este cosustrato (Duff et al., 1995; Mun et al., 2008). Para la concentración de 113 mg L⁻¹ de 246TCP, este proceso sufrió una cierta inhibición, lo que condujo a una acumulación final de 246TCP (Figura 4.4e). La inhibición metanogénica que se apunta en la Tabla 4.2 puede asociarse con la acumulación final de clorofenoles en el medio.

4.3.4.6 Metanol

Mediante el empleo de metanol, la degradación de 246TCP resultó muy rápida en las primeras 400 horas del proceso, sin generación de metabolitos secundarios. Fue a partir de la tercera alimentación cuando la concentración de 4CP aumentó considerablemente hasta acumularse en el medio (Figuras 4.3f y 4.4f). Este hecho sugiere que los gránulos anaerobios bioacumularon el 246TCP para degradarlo posteriormente. La ruta metabólica sucede de nuevo mediante *orto*-decoloración, aunque la ligera tendencia decreciente de la concentración del 4CP al final de ambos experimentos sugiere que también tuvo lugar cierto grado de *para*-decoloración. Esta sugerencia se ve reforzada por el hecho de que apareciese en los días finales del experimento una cierta cantidad de fenol (Tabla 4.1). El metanol parece ser el donante de electrones más efectivo si se tiene en cuenta la elevada velocidad de decoloración alcanzada con este cosustrato. Además, aunque se dio una significativa inhibición metanogénica, entre el

50-80% respecto al blanco, se obtuvieron valores significativamente elevados de SMA (Tabla 4.2).

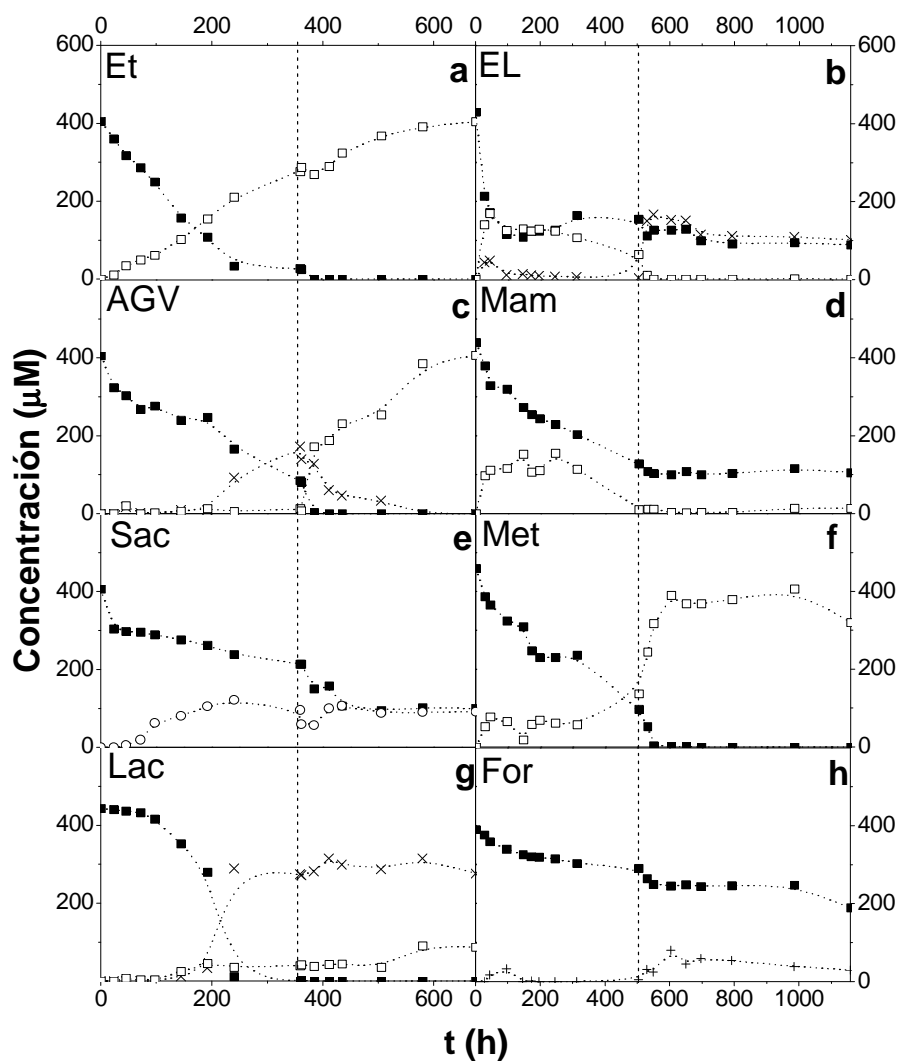


Figura 4.3: Evolución del 246TCP y sus metabolitos secundarios más representativos con los diferentes cosustratos a concentraciones de 246TCP de 80 mg L^{-1} ($405 \text{ } \mu\text{M}$): 246TCP (■), 24DCP (X), 26DCP (+), 4CP (□), 2CP (○).

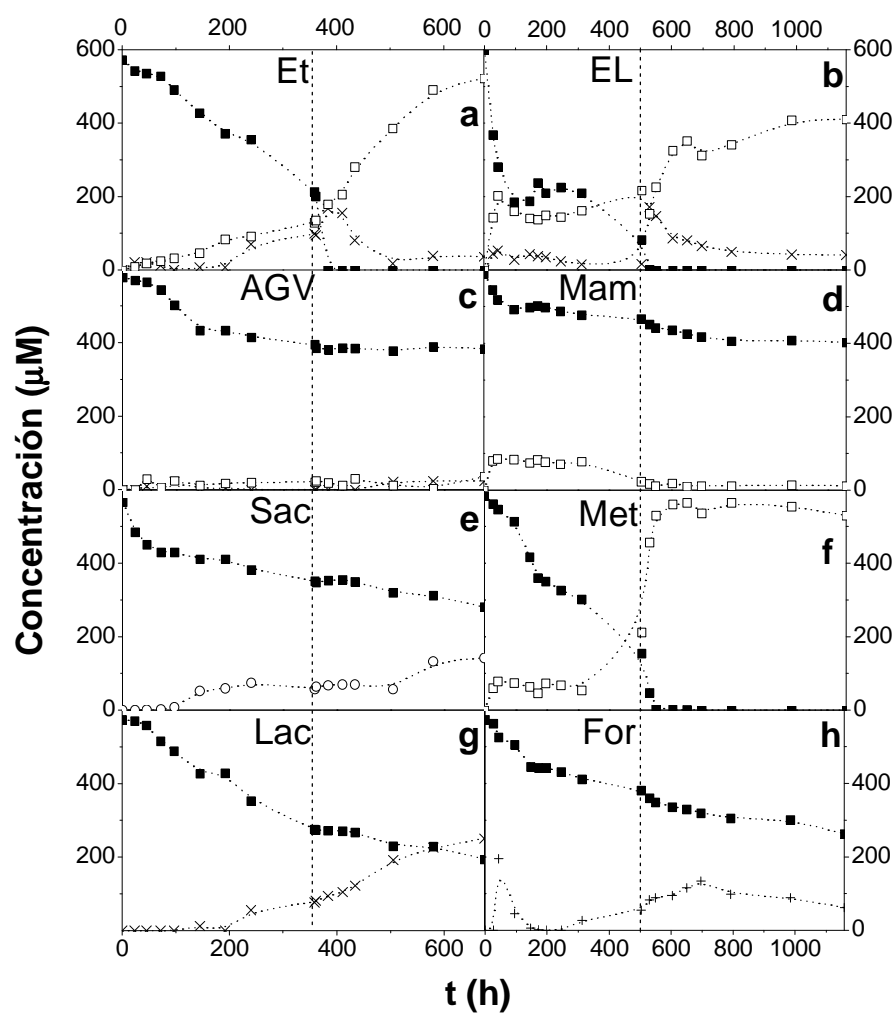


Figura 4.4: Evolución del 246TCP y sus metabolitos secundarios más representativos con los diferentes cosustratos a concentraciones de 246TCP de 113 mg L^{-1} (572 μM): 246TCP (■), 24DCP (X), 26DCP (+), 4CP (□), 2CP (○).

4.3.4.7 Lactato

Este cosustrato es ampliamente utilizado en procesos biológicos de dechloración reductiva, ya que promueve la *orto*-dechloración de 246TCP a 24DCP. La acumulación de este metabolito en los experimentos a 80 y 113 mg 246TCP L⁻¹ (Figuras 4.3g y 4.4g) apunta a que la dechloración de 24DCP a 4CP está inhibida. Magar et al. (1999) mostraron que la degradación de 246TCP junto a la del 24DCP generan un comportamiento inhibitorio de tipo competitivo. Además, el hecho de que la metanogénesis esté severamente afectada (Tabla 4.2) muestra que este cosustrato resulta ineficiente en el tratamiento biológico anaerobio de aguas residuales industriales contaminadas con 246TCP si se pretende, como es habitual, eliminar este compuesto reduciendo la carga orgánica del agua.

Tabla 4.1: Eficiencia de biodegradación de 246TCP y valores máximos de concentración alcanzados, expresados como porcentaje molar de la concentración inicial de 246TCP, de los metabolitos secundarios.

Cosustrato	246TCP	24DCP		26DCP		4CP		2CP		Fenol	
	(%)	(%)*	Tipo**	(%)	Tipo	(%)	Tipo	(%)	Tipo	(%)	Tipo
Et	100,0	2,0	IR	ND	-	98,0	PF	ND	-	ND	-
	100,0	15,0	IR	ND	-	95,0	PF	ND	-	ND	-
EL	79,3	38,6	IR	15,3	IR	39,5	IR	31,9	IR	27,7	IR
	100,0	28,5	IR	13,3	IR	68,5	PF	27,0	IR	22,7	IR
AGV	100,0	42,5	IR	ND	-	100	PF	ND	-	ND	-
	33,6	4,2	PF	ND	-	6,2	PF	ND	-	ND	-
Mam	76,1	5,7	IR	ND	-	35,2	IR	10,2	IR	7,5	IR
	31,6	2,7	IR	ND	-	14,4	PF	2,0	IR	8,1	IR
Sac	75,3	38,8	PF	9,3	IR	ND	-	30,0	IR	18,4	IR
	50,5	13,3	PF	7,8	IR	ND	-	25,1	PF	19,4	IR
Met	100,0	22,2	IR	ND	-	88,5	IR	ND	-	7,2	IR
	100,0	19,7	IR	ND	-	96,9	PF	ND	-	5,0	IR
Lac	100,0	71,1	PF	ND	-	20,3	PF	ND	-	ND	-
	66,2	43,7	PF	ND	-	6,3	PF	ND	-	ND	-
For	51,4	15,1	PF	20,8	IR	ND	-	21,3	IR	11,8	IR
	54,3	7,7	PF	34,0	IR	ND	-	12,2	IR	7,1	IR

ND: No Detectado.

**PF: Producto final; IR: Intermedio de reacción.

4.3.4.8 Formiato

La acumulación de 26DCP, especialmente después de la tercera alimentación (Figuras 4.3h y 4.4h), revela que con este cosustrato tuvo lugar *para*-decloración. Este hecho se deriva de la necesidad de adaptación de las bacterias que degradan formiato y realizan decloración reductiva (Field y Sierra-Álvarez, 2008). No obstante, la fuerte inhibición metanogénica registrada en la tercera alimentación sugiere una competencia por el formiato entre el tipo de bacterias antes mencionado y los metanógenos autotróficos. Este hecho, unido con el efecto inhibitorio del 246TCP, puede causar una inhibición parcial de ambas comunidades microbiológicas, relación opuesta a la sintrofia observada con el empleo de etanol como cosustrato.

Tabla 4.2: Valores medios de la SMA los diferentes cosustratos empleados.

Alimentación	246TCP (mg L ⁻¹)	SMA (g CH ₄ -DQO g ⁻¹ VSS d ⁻¹)							
		Lac	Sac	AGV	Et	For	Met	Mam	EL
2	0	0,355	0,328	0,294	0,337	0,229	1,059	0,117	0,243
	80	0,142	0,146	0,054	0,402	0,226	0,587	0,119	0,113
	113	0,091	0,118	0,029	0,192	0,220	0,400	0,048	0,029
3	0	0,377	0,314	0,201	0,206	0,164	0,554	0,150	0,417
	80	0,031	0,113	0,004	0,365	0,056	0,107	0,001	0,063
	113	0,006	0,127	0,011	0,150	0,054	0,119	0,008	0,037

4.3.5 Ruta degradativa anaerobia

Teniendo en cuenta la información obtenida en los ensayos realizados con los diferentes cosustratos, en la Figura 4.5 se recoge la ruta metabólica de decloración biológica de 246TCP. El esquema de reacción propuesto plantea predominantemente una ruta metabólica vía *orto*-decloración, donde el 246TCP es consecutivamente declorado a 24DCP y 4CP. Como la decloración de 4CP está limitada en condiciones anaerobias, el 246TCP no podría ser completamente biodegradado mediante esta vía, sino a través de la *para*-decloración, la cual llevaría a la formación de 2CP, que puede ser declorado más fácilmente que el 4CP. De todas formas, el esquema desarrollado no tiene en cuenta efectos inhibitorios, lo que es de suma importancia. En cualquier caso, parece ser que utilizando sacarosa y

extracto de levadura junto a algún alcohol (bien etanol o metanol), ambas vías podrían darse conjuntamente y, de esta forma, la dechloración de 246TCP podría ser completa. Ciertos cosustratos, como la metilamina y el formiato, necesitan ser estudiados en detalle para poder entender los efectos inhibitorios que se describen en este trabajo.

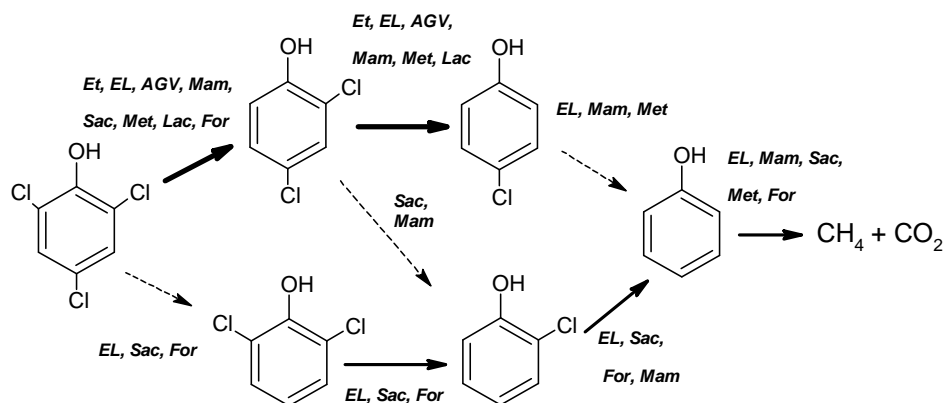
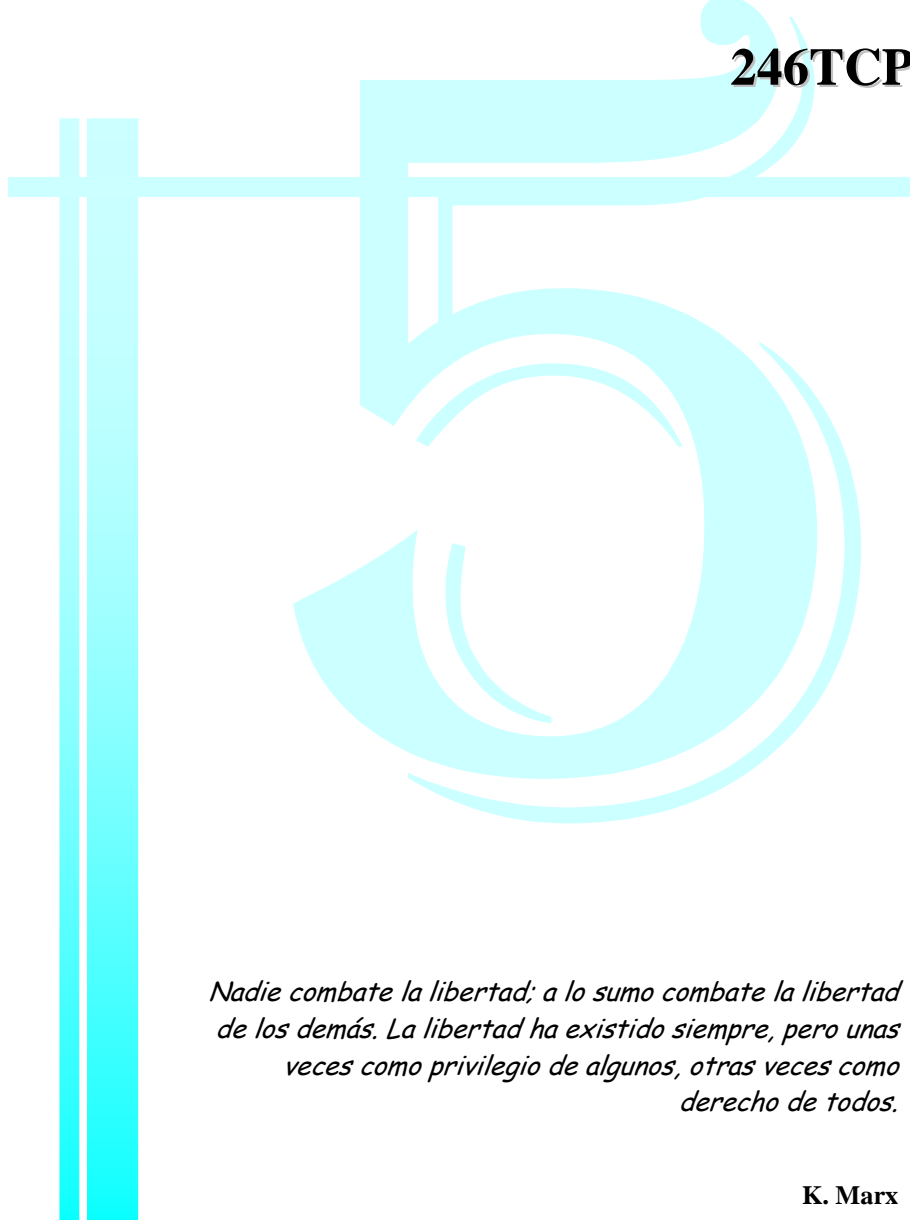


Figura 4.5: Ruta de degradación anaerobia de 246TCP.

CAPÍTULO 5

INHIBICIÓN DE LODO GRANULAR ANAEROBIO NO ADAPTADO POR 246TCP



*Nadie combate la libertad; a lo sumo combate la libertad
de los demás. La libertad ha existido siempre, pero unas
veces como privilegio de algunos, otras veces como
derecho de todos.*

K. Marx

Resumen:

Se ha estudiado la biodegradación de 246TCP en ensayos en discontinuo utilizando lodo granular anaerobio no adaptado. Se utilizó como fuente de carbono y energía una mezcla de cosustratos (sacarosa, etanol, y extracto de levadura) en concentración de 4 g DQO L⁻¹ con una proporción másica de DQO 3:2:0,1. El intervalo de concentraciones de 246TCP ensayado varió entre 3,3 y 200 mg L⁻¹, lo que permitió estudiar el proceso en condiciones no inhibitorias e inhibitorias. Los ensayos se realizaron mediante la adición de tres alimentaciones sucesivas de nutrientes. El 246TCP se añadió en la segunda alimentación. La máxima velocidad de degradación de 246TCP se observó tras la adición de 246TCP en las primeras horas de la 2ª y 3ª alimentación. Los principales intermediarios de degradación de 246TCP fueron 24DCP y 4CP, lo que indica decloración principalmente por vía *orto*, aunque la aparición de compuestos derivados de *para*-decloración (26DCP y 2CP), demostró que esta vía metabólica también tuvo lugar. Respecto a la producción de metano y consumo de DQO, se encontró que el 246TCP ejerció un efecto inhibitorio sobre ambos procesos, que fue reversible hasta 50 mg 246TCP L⁻¹. Se encontró una relación lineal entre las velocidades medias de ambos procesos, lo cual indica que el 246TCP ejerció un efecto inhibitorio no específico. Respecto a la metanogénesis, se observó que el 246TCP ejerció un efecto inhibitorio principalmente sobre la metanogénesis acetoclástica.

Ajustando la metanogénesis acetoclástica a un modelo de pseudo-primer orden con inhibición acompetitiva, se encontró que la inhibición en la 3ª alimentación fue superior a la de la 2ª a partir de 75 mg 246TCP L⁻¹. De manera análoga, se obtuvieron las mismas conclusiones en el caso de la inhibición del consumo de DQO al ajustar los datos experimentales a un modelo de Monod con inhibición acompetitiva. Finalmente, la biodegradación de 246TCP durante todo el proceso se ajustó a un modelo de Haldane de orden n , de manera diferencial (método de las velocidades iniciales teniendo en cuenta la fase de latencia detectada), e integral (tomando los valores de concentración durante todo el periodo experimental).

5.1 Introducción

La producción de metano como una medida de la actividad global de la digestión anaerobia se ha utilizado en numerosas ocasiones para determinar el grado de toxicidad de compuestos de diversa naturaleza (Chen et al., 2008). Para determinar la toxicidad, es habitual referirse a la EC_{50} de la metanogénesis (Olguin-Lora et al., 2003; Vidal y Díez, 2005), e incluso se ha llegado a proponer este método como bioensayo de toxicidad estándar (Codina et al., 1998). Sin embargo, el cálculo de la EC_{50} no proporciona información sobre la forma en que los compuestos tóxicos afectan a los microorganismos metanogénicos. Debido a la falta de consistencia en los tiempos de exposición entre estudios, que varían entre 30 min (Dutka et al., 1983) y 285 h (Johnson y Young, 1983), las concentraciones inhibitorias pueden variar de manera significativa (Chen et al., 2008).

Aunque en torno al 70% de la producción de metano en un proceso anaerobio procede del acetato, se conoce que la metanogénesis hidrogenotrófica es mucho más rápida (Gavala et al., 2003), ya que la ruta metabólica es más sencilla y el proceso es termodinámicamente más favorable. Además, la generación de hidrógeno molecular ya sucede durante la fermentación anaerobia de sustratos carbonosos, previamente a la generación de acetato (acetogénesis), por lo que los microorganismos metanogénicos hidrogenótrofos disponen de sustrato con anterioridad que los acetoclásticos (Zehnder y Colberg, 1986). Todo ello implica que los efectos inhibitorios de los compuestos tóxicos se adviertan de forma más acusada sobre la metanogénesis acetoclástica. Por ello, la separación de los procesos inhibitorios sobre cada una de las comunidades metanogénicas permite un mejor control del proceso de degradación anaerobio y la previsión de situaciones no deseadas en reactores a escala industrial.

Es necesario establecer el mecanismo de inhibición mediante estudios cinéticos que expliquen el comportamiento del inhibidor durante la metanogénesis y permitan actuar de forma previsor sobre el funcionamiento de los reactores anaerobios. Es muy común explicar cinéticamente la metanogénesis mediante modelos de pseudo-primer orden (Lokshina y Vavilin, 1999), dado que la concentración de sustrato no suele ser limitante. La adición de factores inhibitorios (generalmente no competitivos) sobre estos modelos ha permitido prever

situaciones de toxicidad sobre comunidades metanogénicas afectadas por compuestos fenólicos, por lo que este método se ha establecido como protocolario en el modelo ADM1 (Fezzani y Cheikh, 2009).

La degradación de clorofenoles mediante lodos metanogénicos no adaptados, donde principalmente se dan procesos de dechloración reductiva cometabólica, es mucho más lenta que en lodos adaptados, donde existe además halorespiración (Field y Sierra-Álvarez, 2006), aunque la adaptación en discontinuo mediante adiciones sucesivas permite mejorar la velocidad y la eficiencia del proceso (Ye y Shen, 2004). La dechloración de 246TCP en entornos anaerobios no adaptados sucede prominentemente por vía *orto*, generando 24DCP, que se dechlorará a 4CP. La dechloración en posición *para* sólo es posible cuando el lodo está aclimatado. En caso contrario, el 4CP aparecerá como producto final (Takeuchi et al., 2000). La cinética de dechloración de 246TCP a 24DCP en lodos anaerobios no adaptados se explica habitualmente mediante el modelo de Monod (Magar et al., 1999; Atuanya y Chakrabarti, 2003), aunque no hay consenso en los valores de los parámetros del modelo, debido fundamentalmente a que este modelo no tiene en cuenta factores de inhibición. La degradación de otros clorofenoles, en cambio, si ha sido explicada con modelos inhibitorios, como el modelo de Haldane (Ning et al., 1997).

En este capítulo se presentan los resultados del tratamiento anaerobio de 246TCP en discontinuo con lodo granular anaerobio no adaptado, prestando atención a la inhibición que ejerce el 246TCP en la metanogénesis y en el consumo de DQO. Asimismo, se presentan los resultados del ajuste de la dechloración de 246TCP a un modelo de Monod con inhibición acompetitiva.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Fuente de biomasa

Se utilizó como fuente de biomasa el mismo lodo granular anaerobio empleado en los ensayos descritos en el Capítulo 4.

5.2.2 Ensayos de inhibición

Los ensayos se realizaron en semicontinuo con botellas de suero de 0,25 L inoculadas con 1,5 g SSV L⁻¹ de lodo granular lavado previamente con PBS. La fuente de macro y micronutrientes se preparó de igual forma que en el Capítulo 2. Como fuente de carbono y energía se añadieron 4 g DQO L⁻¹ de una mezcla de sacarosa, etanol y extracto de levadura (cosustratos) en relación másica de DQO 3:2:0,1. Se añadió fuente de alcalinidad a razón de 1 g NaHCO₃ g⁻¹ DQO. Para eliminar el oxígeno disuelto se añadió 1 mL de una disolución de 100 g L⁻¹ de Na₂S·10H₂O. Se intercambió el espacio de cabeza por una mezcla N₂:CO₂ 80:20. Se realizaron tres alimentaciones. En todas ellas se añadieron los cosustratos, el bicarbonato y las sales. La primera alimentación sirvió para activar el lodo. El 246TCP se añadió en la segunda alimentación en concentraciones entre 3,3 y 200 mg L⁻¹ por duplicado, utilizando un blanco sin 246TCP por triplicado. La tercera alimentación se realizó con objeto de evaluar la inhibición producida por 246TCP y eliminar mayor cantidad de 246TCP al disponer de más tiempo y cosustratos. El tiempo total del experimento fue de 71 d.

5.2.3 Métodos analíticos

El análisis de la DQO y de los SSV se realizó de acuerdo con el [APHA Standard Methods \(1992\)](#). Los clorofenoles se cuantificaron mediante HPLC con detector de absorbancia UV haciendo uso del método especificado en el Capítulo 4. El metano producido se cuantificó empleando el método de desplazamiento descrito por [James et al. \(1990\)](#). Los valores de SMA se estimaron mediante el modelo de Roediger ([Edeline, 1980](#)).

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Producción de metano y consumo de DQO

En la Figura 5.1 se muestra la evolución de la producción de metano en los diferentes ensayos utilizando concentraciones crecientes de 246TCP, durante las alimentaciones 2ª y 3ª. La SMA calculada a partir de la segunda y tercera alimentación en el blanco fue de 0,32 y 0,87 g CH₄-DQO d⁻¹ g SSV⁻¹, respectivamente. Estos valores se utilizaron como referencia en la evaluación de la inhibición metanogénica debida a la presencia de 246TCP. Se observa una pérdida en la actividad metanogénica como consecuencia de la concentración de 246TCP empleada. Así, para concentraciones entre 50 y 200 mg 246TCP L⁻¹, se detectó una disminución de la SMA de entre el 25 y el 94% en la 2ª alimentación. La disminución de actividad metanogénica durante la 3ª alimentación fue muy superior ya que se observaron porcentajes de disminución de la SMA de entre el 77 y el 98% para el mismo intervalo de concentraciones de 246TCP, respectivamente. Esto implica que la inhibición provocada por este compuesto es acumulativa, provocando disminuciones de la SMA superiores en adiciones sucesivas de sustrato que en la primera adición. En cualquier caso, este tipo de inhibición puede ser reversible si se deja de suministrar 246TCP, como ha quedado patente en otros trabajos ([Collins et al., 2005](#)).

Por otra parte, como puede observarse en la Figura 5.1, la producción de metano no fue homogénea durante el experimento, ya que se detectaron dos tendencias con pendientes de producción diferentes, generando curvas de producción bifásicas. Durante los 3 primeros días se generó en torno al 30% del metano producido en el blanco, mientras que el 70% restante se produjo durante el resto del experimento. En la segunda alimentación se observó una disminución en la cantidad de metano generada al aumentar la concentración de 246TCP a partir del tercer día de experimentación. Sin embargo, en la tercera alimentación, el metano producido disminuyó tanto en los primeros días como durante el resto del experimento. La aparición de curvas bifásicas de producción de metano sugiere la ocurrencia de dos procesos metanogénicos independientes (diauxia), una situación típica en la digestión anaerobia de sustratos complejos ([Lee et al., 2009b](#)). En la digestión anaerobia de la sacarosa, etanol y

extracto de levadura hasta acetato (acidogénesis y acetogénesis) se genera gran cantidad de hidrógeno. Debido a que estas etapas son más rápidas que la metanogénesis, la acumulación de hidrógeno genera un aumento inicial en la metanogénesis hidrogenotrófica. Posteriormente, cuando la concentración de acetato en el medio comienza a ser relevante, los metanógenos acetoclásticos empiezan a producir metano.

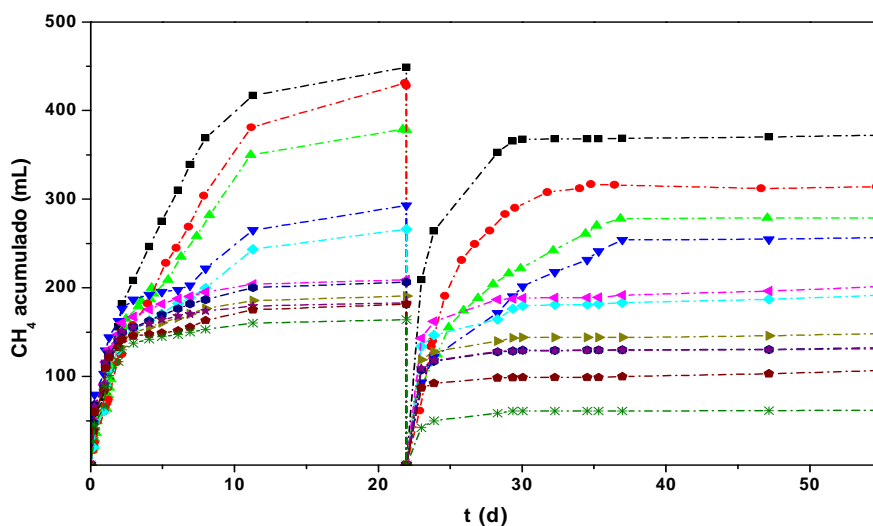


Figura 5.1: Evolución de la producción acumulada de metano en las alimentaciones 2ª y 3ª para concentraciones iniciales de 246TCP de 0 (■), 10 (●), 20 (▲), 50 (▼), 75 (◆), 100 (◀), 110 (▶), 120 (◆), 130 (★), 150 (◆) y 200 (✱) mg L⁻¹.

En presencia de un inhibidor, los metanógenos hidrogenótrofos pueden resistir concentraciones más altas que los acetótrofos sin que su actividad se vea afectada (Collins et al., 2005). De esta forma, en la segunda alimentación la cantidad de metano producida por vía hidrogenotrófica durante los tres primeros días de experimentación no sufrió cambios significativos, mientras que en la tercera alimentación los metanógenos hidrogenótrofos estuvieron expuestos durante un tiempo suficiente para que el 246TCP provocase inhibición

en su actividad. En cambio, los metanógenos acetótrofos soportaron la presencia del 246TCP desde la segunda alimentación, por lo que su actividad fue inhibida durante todo el experimento. [Collins et al. \(2005\)](#) atribuyeron a la población metanogénica hidrogenotrófica la menor sensibilidad al 246TCP, ya que la IC_{50} fue sustancialmente mayor que para la población metanogénica acetoclástica (69 frente a 55 mg 246TCP L⁻¹). [Kim et al. \(1996\)](#) observaron una relativa insensibilidad de los metanógenos hidrogenótrofos a los clorofenoles ya que, tras calcular de manera independiente la producción de metano mediante ambas vías metabólicas de cultivos metanogénicos enriquecidos en etanol, se sometieron dichos cultivos a concentraciones de hasta 300 mg 3CP L⁻¹. Bajo esta concentración, la curva de producción de metano siguió la misma tendencia que la curva obtenida a partir de la utilización de hidrógeno molecular como sustrato, por lo que se dedujo que los metanógenos hidrogenótrofos son insensibles a concentraciones relativamente elevadas de este compuesto, mientras que los acetoclásticos se mostraron completamente inhibidos bajo estas concentraciones.

La evolución de la DQO se muestra en la Figura 5.2. El 246TCP afectó el consumo de DQO de manera que, durante el periodo de estudio, en la segunda adición de sustrato la inhibición en el consumo de DQO varió entre el 35 y el 81% en un intervalo de concentraciones entre 50 y 200 mg 246TCP L⁻¹, mientras que en la tercera adición esta inhibición varió entre el 27 y el 84% para el mismo intervalo de concentraciones de 246TCP. Esto supone que el consumo de DQO se recuperó ligeramente hasta concentraciones de 246TCP de 100 mg L⁻¹, mientras que a concentraciones superiores se detectó una inhibición superior. [Collins et al. \(2005\)](#) encontraron que la actividad de parte de la microbiota bacteriana, en concreto de las bacterias degradadoras de propionato, sufre una inhibición reversible al contacto con el 246TCP. De igual forma que sucedió con la producción de metano, se detectaron dos tendencias en las curvas de consumo de DQO. La reducción de la DQO durante los tres primeros días de digestión fue, en términos de DQO, inferior a la producción de metano. Esto refuerza la suposición de que la metanogénesis sucedió principalmente por vía hidrogenotrófica durante los primeros días, ya que este tipo de metanogénesis produce una disminución muy ligera en la DQO.

Para analizar con más detalle el comportamiento del lodo anaerobio en presencia de 246TCP, se emplearon concentraciones inferiores de dicho compuesto (de entre 3,3, y 10 mg

L^{-1}). En la Figura 5.3a se observa inhibición metanogénica incluso a bajas concentraciones de 246TCP, con una reducción de la producción de metano del 20% para una concentración de $10 \text{ mg } L^{-1}$. Sin embargo, en la tercera adición esta inhibición fue sensiblemente inferior, debido probablemente a que el 246TCP se ha degradado. Ello sugiere, en concordancia con los resultados de Collins et al. (2005), que el 246TCP ejerce una inhibición reversible sobre la metanogénesis. En el consumo de DQO, por el contrario, no se detectó inhibición en este intervalo de concentraciones (Figura 5.3b), lo que indica que los organismos metanogénicos son ligeramente más sensible a la toxicidad de este compuesto. A concentraciones mayores de $50 \text{ mg } 246TCP \text{ } L^{-1}$ se aprecian similitudes entre la inhibición provocada por este compuesto sobre el consumo de DQO y sobre la metanogénesis. Para poder comparar ambos procesos, en la Figura 5.4 se muestra la evolución de la producción de metano y del consumo de DQO para concentraciones de 246TCP de entre 0 y $200 \text{ mg } L^{-1}$. Como puede observarse, el efecto del 246TCP sobre estos procesos resultó similar, por lo que se puede afirmar que la toxicidad de este compuesto afectó de forma no selectiva a toda la comunidad de microorganismos.

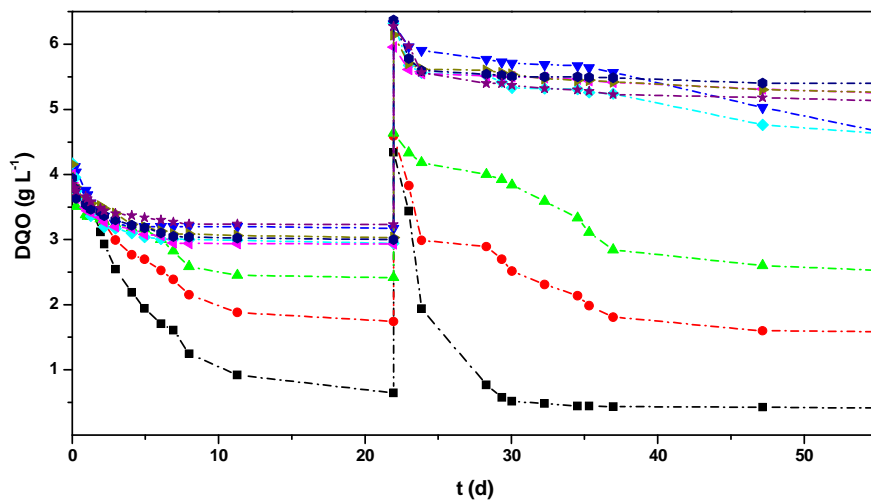


Figura 5.2: Evolución de la DQO en las alimentaciones 2ª y 3ª durante los ensayos a concentraciones de 246TCP de 0 (■), 50 (●), 75 (▲), 100 (▼), 110 (◆), 120 (◆), 130 (◆), 150 (●) y 200 (★) $\text{mg } L^{-1}$.

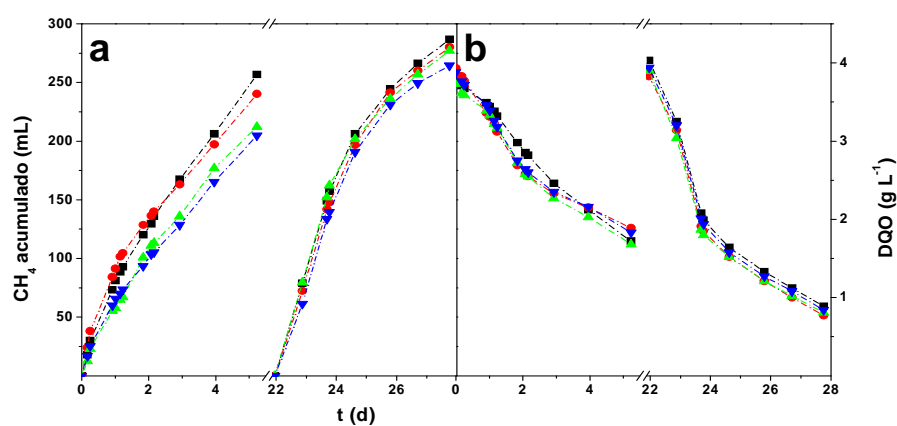


Figura 5.3: Evolución de la producción de metano (a) y consumo de DQO (b) para concentraciones de 246TCP de 0 (■), 3,3 (●), 6,6 (▲) y 10 (▼) mg L⁻¹.

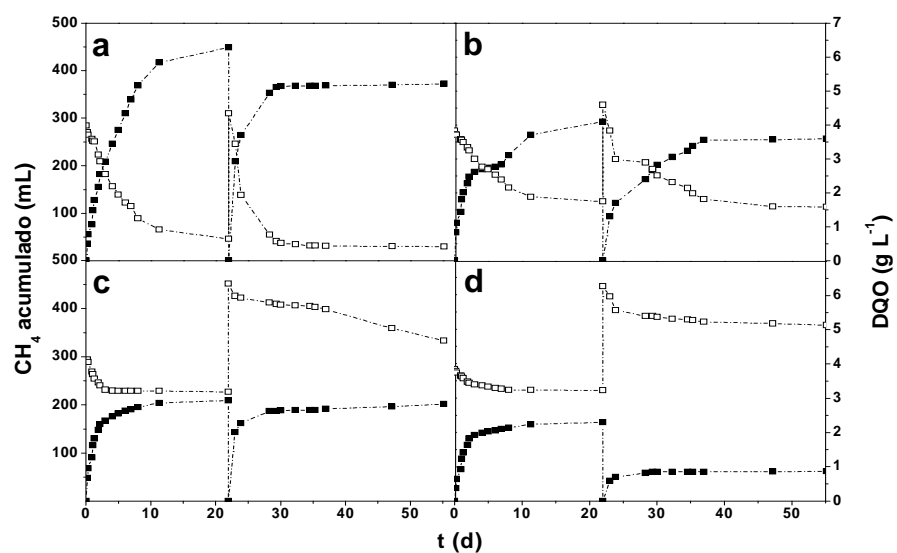


Figura 5.4: Evolución de la producción de CH₄ (■) y del consumo de DQO (□) para concentraciones de 246TCP de 0 (a), 50 (b), 100 (c) y 200 (d) mg L⁻¹.

5.3.2 Aproximación cinética de la metanogénesis y del consumo de DQO

5.3.2.1 Cálculo de los parámetros cinéticos

Los cambios en la actividad del lodo anaerobio, tanto en la metanogénesis como en el consumo de DQO, estuvieron estrechamente relacionados con la concentración de 246TCP empleada, por lo que se realizó una comparación de los parámetros cinéticos empleando las velocidades media (V_m) e inicial (V_o) de ambos procesos en función de la concentración de 246TCP. En la Figura 5.5 se representan los valores de estos parámetros en las alimentaciones segunda y tercera en función de la concentración de 246TCP. Las velocidades iniciales se calcularon por regresión lineal tomando un mínimo de 4 valores, aunque en el caso de la metanogénesis, estos valores se tomaron a partir de la pendiente de la metanogénesis acetoclástica, que como se ha comentado resultó la más afectada por la presencia de 246TCP. Las velocidades medias se calcularon como la media de las velocidades instantáneas.

Se observa un perfil potencial en la relación entre las velocidades iniciales y la concentración de 246TCP. El porcentaje de inhibición a 200 mg 246TCP L⁻¹ varió desde el 93,4 y 75,6% en la segunda alimentación hasta el 98,9 y 96,3% en la tercera alimentación para la producción de metano y el consumo de DQO, respectivamente. En cambio, tanto la producción de metano como el consumo de DQO fue superior durante la tercera alimentación en los ensayos de hasta 50 mg 246TCP L⁻¹, lo cual implica que hasta esta concentración los microorganismos se adaptaron a la presencia de 246TCP, mientras que para valores superiores la inhibición fue acumulativa.

En la Figura 5.6 se presenta la relación entre las velocidades medias de producción acetoclástica de metano y consumo de DQO en las alimentaciones 2ª y 3ª. La relación lineal detectada indica que la acción inhibitoria fue proporcional, lo cual implica un tipo de inhibición no selectivo. Además, debido a que en la 3ª alimentación la pendiente de esta relación es superior (11,53 frente a 8,81), se puede afirmar que en el cómputo global del proceso, el efecto acumulativo de la inhibición fue más acusado en la metanogénesis acetoclástica.

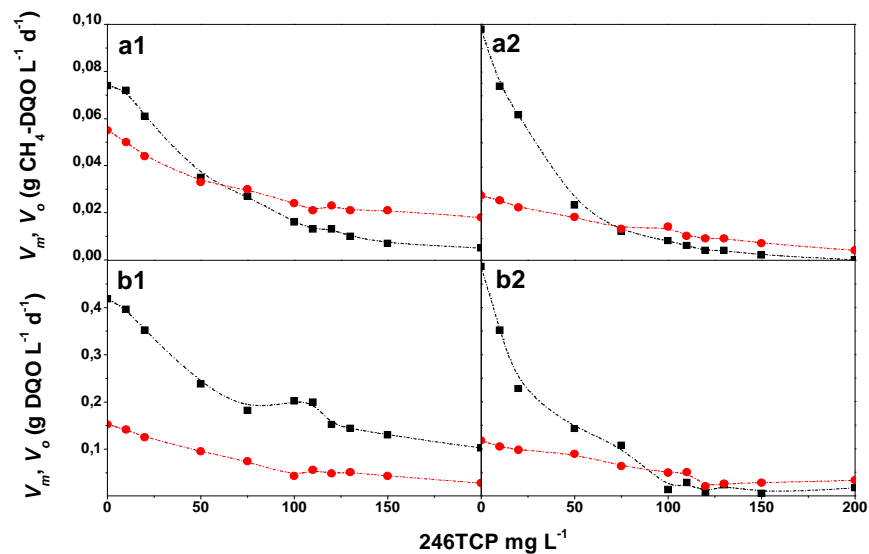


Figura 5.5: Relación entre las velocidades inicial (■) y media (●) calculadas para la producción de metano (a) y el consumo de DQO (b) con la concentración inicial de 246TCP en las alimentaciones segunda (1) y tercera (2).

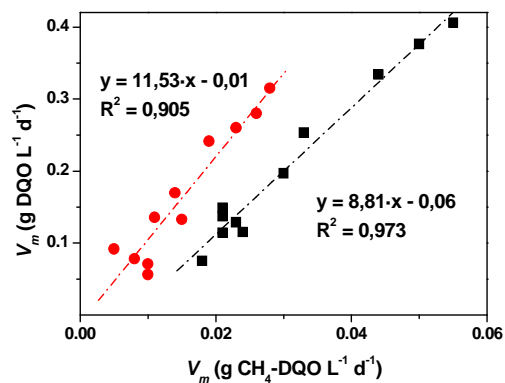


Figura 5.6: Relación entre las velocidades medias de la metanogénesis acetoclástica y el consumo de DQO para las alimentaciones 2ª (■) y 3ª (●). Ajuste lineal (línea discontinua).

5.3.2.2 Modelización cinética de los procesos inhibitorios

Se evaluó la inhibición en el consumo de la DQO y la metanogénesis mediante una aproximación cinética empleando el método de las velocidades iniciales. Para el desarrollo del modelo cinético de consumo de DQO se han tenido en cuenta los siguientes supuestos:

1. El consumo de DQO en ausencia de 246TCP (blanco) sigue una cinética de Monod, descrita en el Capítulo 1.3 (Ecuación 1.8). Para simplificar el modelo, la concentración de microorganismos se consideró constante a lo largo del proceso, por lo que las constantes μ_{max} , $Y_{X/S}$ y X_o se incluyeron en el parámetro V_{max} (g DQO L⁻¹ d⁻¹) obteniendo de esta forma la Ecuación 5.1, en la que K_s y S representan la constante de saturación y la concentración de sustrato, respectivamente (g DQO L⁻¹).

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{V_{max} \cdot S}{K_s + S} \quad [5.1]$$

2. Existe una fracción de DQO rápidamente biodegradable (S_B) y otra fracción derivada de la descomposición microbiana que es más lentamente biodegradable, por lo que a efectos prácticos se la considerará no biodegradable (S_N). Así, se simplifica el modelo de forma que $S = S_N + S_B$; $S_B = S - S_N$, siendo S_N constante. De esta forma se obtienen las ecuaciones 5.2 y 5.3.

$$\frac{dS_B}{dt} = -\frac{V_{max} \cdot S_B}{K_s + S_B} \quad [5.2]$$

$$\frac{d(S - S_N)}{dt} = -\frac{V_{max} \cdot (S - S_N)}{K_s + (S - S_N)} \quad [5.3]$$

3. En presencia de 246TCP, la Ecuación 5.3 se modifica mediante la incorporación de un término de inhibición acompetitiva:

$$\frac{d(S - S_N)}{dt} = -\frac{V_{max} \cdot (S - S_N)}{K_s + (S - S_N) + (S - S_N) \cdot \left(\frac{I}{K_i} \right)^n} \quad [5.4]$$

en la que I y K_i representan la concentración de 246TCP y la constante de inhibición, respectivamente (mg L^{-1}) y n el orden de inhibición. Teniendo en cuenta sólo las primeras horas del proceso (método de las velocidades iniciales), la Ecuación 5.4 se convierte en la Ecuación 5.5, en la que S_o representa la concentración inicial de DQO (g L^{-1}).

$$\frac{d(S_o - S_N)}{dt} = - \frac{V_{\max} \cdot (S_o - S_N)}{K_s + (S_o - S_N) + (S_o - S_N) \left(\frac{I}{K_i} \right)^n} \quad [5.5]$$

La velocidad de producción de metano se ajusta al modelo de pseudo-primer orden de Roediger (Edeline, 1980). Este modelo ha sido modificado siguiendo los supuestos recogidos en el Capítulo 3 (Ecuación 3.9). Al tener en cuenta sólo las primeras horas del proceso, la producción de metano es nula ($M=0$), por lo que las constantes M_{\max} y k_M se incluyen en V_{\max} ($\text{g CH}_4\text{-DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

$$V_{es} = \frac{V_m}{\left[1 + \left(\frac{I}{K_i} \right)^n \right]} \quad [3.9]$$

Se utilizaron los valores de las velocidades iniciales de producción de metano y consumo de DQO para ajustar los datos a los modelos inhibitorios planteados. Previamente se ajustó la evolución de la DQO en el blanco a la Ecuación 5.3 para obtener las constantes cinéticas del modelo de Monod. Una vez obtenidas, las velocidades iniciales de consumo de DQO y metanogénesis acetoclástica se ajustaron a las Ecuaciones 5.5 y 3.9, respectivamente. El ajuste de la evolución de la DQO del blanco se realizó mediante minimización no lineal por mínimos cuadrados del error en la predicción de la conversión, utilizando un algoritmo simplex seguido del algoritmo de minimización de Powell, empleando el software Scientist 3.0. Los ajustes de los valores de las velocidades iniciales a cada modelo se realizaron mediante el método de Levemberg-Marquardt (ajuste por mínimos cuadrados), obteniendo curvas de simulación de 60 puntos con un intervalo de confianza del 95%, empleando el software Origin 7.5. La bondad de ajuste se determinó mediante el parámetro R^2 .

En la Figura 5.7 se representa el ajuste de la V_o de producción de metano en las alimentaciones 2ª y 3ª, mientras que en la Tabla 5.1 se muestran los valores estimados de los parámetros cinéticos del modelo planteado. Este modelo predice con exactitud la inhibición metanogénica detectada debido a la bondad de ajuste determinada. Además, el error relativo del valor de los parámetros fue significativamente bajo, lo que verifica la precisión del ajuste. Se observan diferencias en los ajustes para cada alimentación. La K_i resultó ser menor en la tercera alimentación, mientras que sucedió lo contrario con el valor de n , lo que permite afirmar que la inhibición metanogénica fue distinta en cada alimentación, tanto en la intensidad de la inhibición (n) como en la concentración inhibitoria (K_i). Estas diferencias se vinculan con la desaparición de 246TCP durante la 3ª alimentación para concentraciones superiores a 25 mg L⁻¹. La presencia de los intermedios de degradación acumulados provocaron un efecto inhibitorio inferior al de 246TCP, dado que la toxicidad de este compuesto es superior, como ha sido previamente mostrado (Patel et al., 1991).

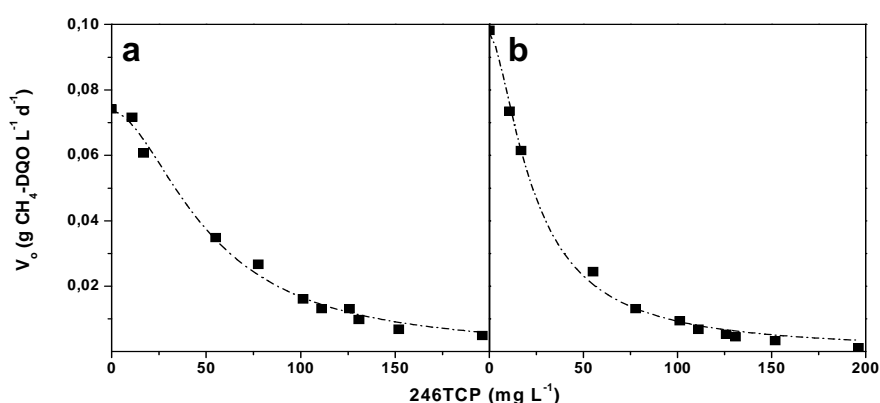


Figura 5.7: Ajuste de los valores de la V_o de producción de metano a la Ecuación 3.9 en las alimentaciones 2ª (a) y 3ª (b).

Tabla 5.1: Parámetros cinéticos de la Ecuación 3.9 estimados.

Alimentación	V_{Max} (g CH ₄ -DQO L ⁻¹ d ⁻¹)	K_i (mg 246TCP L ⁻¹)	n (adimensional)	R^2
2ª	0,073 ± 0,001	50,9 ± 3,5	1,81 ± 0,15	0,994
3ª	0,097 ± 0,002	23,6 ± 1,2	1,56 ± 0,07	0,997

En la Figura 5.8 se muestra el ajuste de la evolución de la DQO al modelo de Monod modificado (Ecuación 5.3) en el ensayo blanco. Los parámetros estimados de este ajuste se representan en la Tabla 5.2. Estos parámetros se fijaron como constantes en los ajustes de las velocidades iniciales posteriores, que se representan en la Figura 5.9 para las alimentaciones 2ª y 3ª. En la Tabla 5.3 se recogen los valores de los parámetros de la Ecuación 5.5 determinados para ambas alimentaciones.

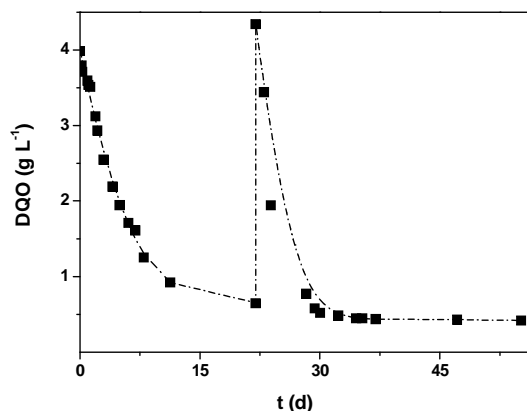


Figura 5.8: Ajuste de la evolución de la DQO en el ensayo blanco al modelo de Monod modificado.

Tabla 5.2: Parámetros estimados del ajuste al modelo de Monod modificado.

<i>Alimentación</i>	V_{max} (g DQO L ⁻¹ d ⁻¹)	K_m (g DQO L ⁻¹)	S_N (g DQO L ⁻¹)	R^2
1ª	1,09 ± 0,36	3,75 ± 2,05	0,63 ± 0,09	0,999
2ª	1,33 ± 0,85	2,62 ± 1,96	0,43 ± 0,05	0,975

La bondad de ajuste determinada implica que las asunciones son empíricamente correctas, por lo que se puede afirmar que el 246TCP ejerce una inhibición acompetitiva sobre el consumo de sustratos orgánicos. Asimismo existió, como en el caso de la metanogénesis, un efecto inhibitorio diferente en las alimentaciones 2ª y 3ª, debido a la divergencia en los parámetros de inhibición obtenidos (K_i y n , ver Tabla 5.3). Ello puede ser debido a la desaparición del 246TCP a concentraciones menores de 20 mg 246TCP L⁻¹.

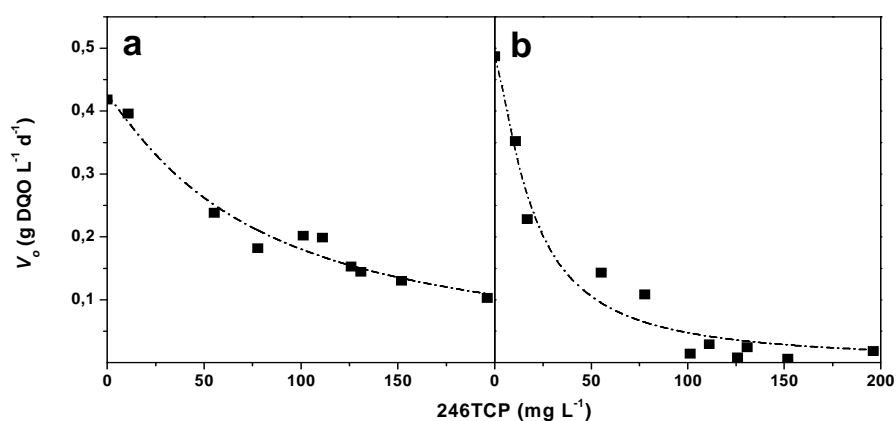


Figura 5.9: Ajuste de los valores de la V_o de consumo de DQO a la Ecuación 5.5 en las alimentaciones 2^a (a) y 3^a (b).

Tabla 5.3: Parámetros cinéticos de la Ecuación 5.5 estimados.

Alimentación	V_{max} (g DQO L ⁻¹ d ⁻¹)	K_i (mg 246TCP L ⁻¹)	n (adimensional)	R^2
2 ^a	0,899 ± 0,039	39,1 ± 8,1	1,12 ± 0,17	0,974
3 ^a	0,817 ± 0,054	13,1 ± 2,7	1,35 ± 0,18	0,968

Por otra parte, se puede observar que la inhibición provocada por el 246TCP se produce a concentraciones menores para el consumo de DQO que para la producción de metano, ya que en las dos alimentaciones los valores de la constante de inhibición fueron ligeramente inferiores (50,9 y 23,6 mg 246TCP L⁻¹ para la producción de metano frente a 39,1 y 13,1 mg 246TCP L⁻¹ para el consumo de DQO en las alimentaciones 2^a y 3^a, respectivamente). Pero también se descubrió que la intensidad de la inhibición (representada por el parámetro n) fue superior en la metanogénesis (1,81 y 1,56 para la producción de metano frente a 1,12 y 1,35 para el consumo de DQO en las alimentaciones 2^a y 3^a, respectivamente), lo que significa que, sometidos a concentraciones inhibitorias, los microorganismos metanogénicos acetoclásticos acusaron con mayor gravedad el efecto del 246TCP. No se han encontrado trabajos que relacionen la concentración de 246TCP con la

cinética de degradación de DQO. En un trabajo parecido, trabajando con 4-nitrofenol y glucosa como cosustrato y ajustando el consumo de DQO a un modelo de inhibición acompetitivo, se obtuvo que la V_{max} del proceso se situaba en el intervalo 56-89 g DQO L⁻¹ d⁻¹, aunque en este trabajo sólo se siguió la evolución temporal de la glucosa, y no de toda la DQO presente en los medios de reacción. La constante de inhibición acompetitiva fue establecida en el intervalo 14-43 mg 4-nitrofenol L⁻¹ (Kuscu y Sponza, 2009). En el citado trabajo se asumió un orden de inhibición igual a 1, por lo que los coeficientes de correlación obtenidos fueron mucho menores que los determinados en este trabajo ($R^2=0,77-0,59$).

5.3.3 Biodegradación de 246TCP

En la Figura 5.10 se muestra la evolución del 246TCP para los ensayos con las distintas concentraciones iniciales aplicadas. Como puede apreciarse, durante el tiempo de estudio se logró la biodegradación completa de este compuesto hasta concentraciones iniciales de 100 mg L⁻¹. A partir de este valor, las eficiencias disminuyeron hasta un valor mínimo obtenido en el ensayo de 200 mg L⁻¹ (29%). Por otra parte, se detectó un periodo de latencia (*lag phase*) en la degradación del 246TCP que dependió de la concentración inicial de este compuesto. Este periodo fue de 20, 100 y 300 h para concentraciones iniciales de 3,3, 50 y 150 mg L⁻¹, y está relacionado con la adaptación de los microorganismos al 246TCP. Este periodo de latencia también se ha dado en otros ensayos similares como el de Chang et al., (1995), y está condicionado, además, por el tiempo que tarda el 246TCP en difundir a través del gránulo y llegar al interior de los microorganismos.

Para concentraciones de 246TCP de hasta 75 mg L⁻¹ todo el 246TCP se degradó durante la segunda alimentación, mientras que a concentraciones superiores fue necesario un segundo aporte de cosustrato para lograr reducir esta concentración al máximo, lo que no se logró a concentraciones mayores de 150 mg L⁻¹. Es de esperar que aplicando un tiempo mayor de digestión, para el rango de concentraciones estudiado, la biodegradación del 246TCP habría sido completa independientemente de su concentración, ya que en los casos en los que no se alcanzó la biodegradación completa, la disminución del 246TCP se mantuvo hasta el final. Además existía suficiente fuente de carbono y poder reductor en el medio para la degradación, debido a la inhibición en el consumo de DQO explicada con anterioridad. Esto

quiere decir que, en el intervalo de concentraciones estudiado, el 246TCP no provoca una inhibición irreversible sobre los microorganismos que realizan su dechloración.

En la Figura 5.11 se presenta la evolución de los diferentes intermedios de degradación de 246TCP en algunos ensayos. Nótese que el eje temporal en los ensayos a 3,3 y 10 mg 246TCP L⁻¹ es diferente que en el resto de ensayos, pues la actividad microbiológica derivada de la dechloración del 246TCP concluye mucho antes para concentraciones bajas de 246TCP. Se observa la aparición de intermedios de degradación propios de las rutas *orto* (24DCP y 4CP) y *para* (26DCP y 2CP), aunque la ruta *orto* resultó más favorecida, siendo el principal producto intermedio acumulado el 4CP. La aparición de estos intermedios de reacción no fue continuada en el tiempo, sino que se produjo mayoritariamente en el momento en el que se suministra cosustrato, al comienzo de las alimentaciones 2ª y 3ª.

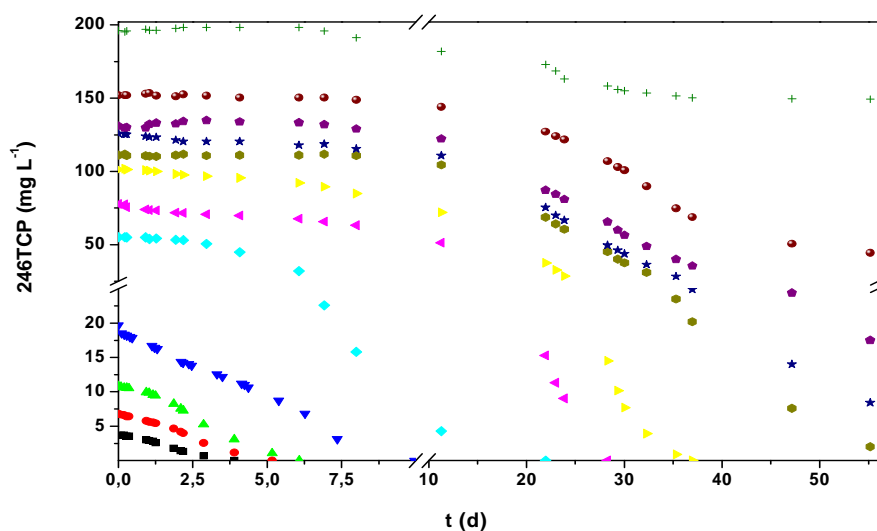


Figura 5.10: Evolución en la concentración de 246TCP durante los ensayos para concentraciones iniciales de 3,3 (■), 6,6 (●), 10 (▲), 20 (▼), 50 (◆), 75 (◀), 100 (▶), 110 (●), 120 (★), 130 (◆), 150 (●) y 200 (+) mg 246TCP L⁻¹.

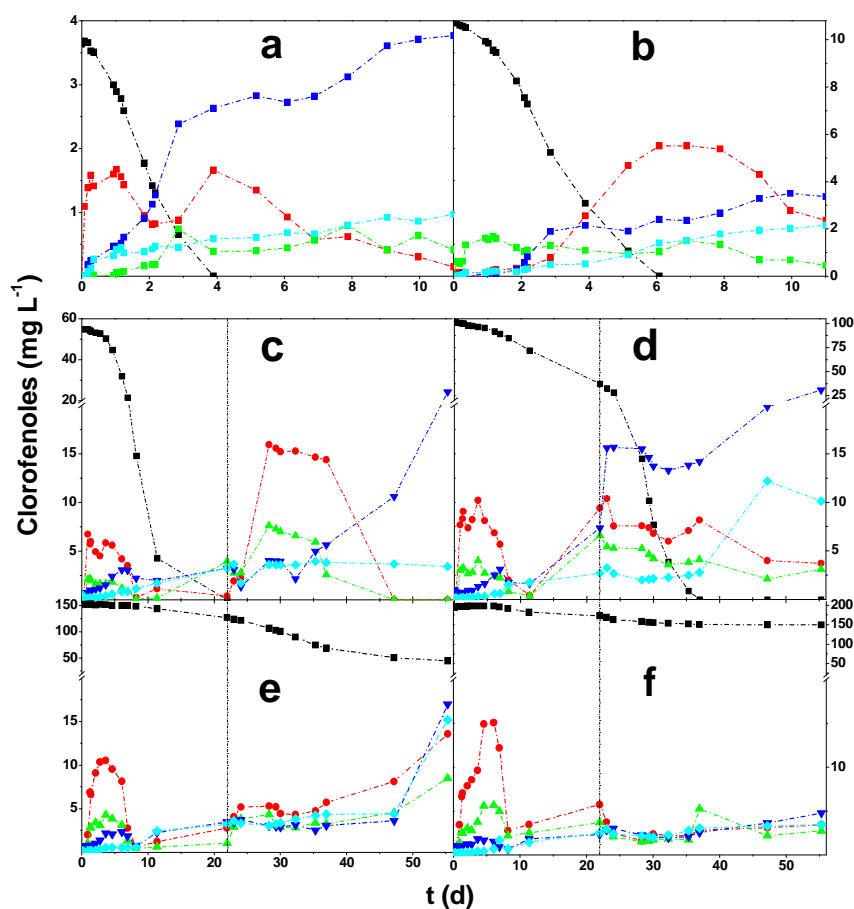


Figura 5.11: Evolución del 246TCP (■) y sus intermedios de degradación: 24DCP (●), 26DCP (▲), 4CP (▼) y 2CP (◆), para concentraciones iniciales de 3,3 (a), 10 (b), 50 (c), 100 (d), 150 (e) y 200 (f) mg 246TCP L⁻¹. La línea discontinua indica la 3^a alimentación.

Se sugiere que el 246TCP es absorbido del medio por la microbiota debido a la acción de los canales de flujo intermembranales, junto a otros sustratos. La transformación del 246TCP, debida tanto a procesos abióticos o cometabólicos, por acción de corrinoides inespecíficos, como a la acción activa de los enzimas deshalogenasas de los organismos halorespiradores, sucedería en el espacio periplásmico (en el caso de bacterias gram-), o en la superficie interna de la membrana celular (en el caso de bacterias gram+), generando los

productos de reacción. Estos productos quedarían retenidos en el interior de la pared celular o sobre el interior de la membrana, debido a la inactividad de los canales de flujo. Cuando, posteriormente, se suministra de nuevo cosustrato, los canales de flujo volverían a activarse, por lo que los intermedios no transformados serían evacuados al exterior. Esta explicación ha sido previamente considerada (Kennes et al., 1996).

Por otro lado, como el 4CP es el principal producto final de la decoloración de 246TCP, se pueden utilizar los valores de concentración finales detectados para explicar el proceso inhibitorio. Así, estos valores aumentan paulatinamente hasta alcanzar un máximo en torno a 32 mg 4CP L⁻¹ para concentraciones iniciales de 246TCP de 100 mg L⁻¹. Por encima de este valor, las concentraciones finales de 4CP disminuyen hasta alcanzar un mínimo en torno a 5 mg 4CP L⁻¹ para una concentración inicial de 246TCP de 200 mg L⁻¹. Algo similar sucede con el resto de clorofenoles detectados. Este hecho sugiere la presencia de un mecanismo de inhibición que es necesario estudiar para comprender el proceso.

5.3.4 Cinética de biodegradación de 246TCP.

Con el objetivo de explicar la posible inhibición en la degradación del 246TCP detectada, se procedió a calcular los parámetros cinéticos del proceso. En la Tabla 5.4 se muestran los valores de las velocidades específicas inicial y máxima de eliminación del 246TCP dentro del rango de concentraciones estudiado. La velocidad inicial se calculó experimentalmente una vez transcurrido el periodo de latencia comentado con anterioridad, tomando un mínimo de 5 valores y calculando su pendiente por regresión lineal. Las velocidades máximas se calcularon como las máximas de las velocidades instantáneas, empleando un mínimo de 3 valores para calcular éstas.

Las velocidades máximas alcanzadas son comparables a las obtenidas por el grupo de Chang et al. (1999), aunque ellos obtuvieron velocidades de 9,12 mg L⁻¹ d⁻¹ para concentraciones de 246TCP de 10 mg L⁻¹, mientras que en el presente trabajo se lograron velocidades de 13,8 mg L⁻¹ d⁻¹. Además, mientras que nuestros datos reflejan conversiones del 100% de 246TCP hasta una concentración de 100 mg L⁻¹, en el trabajo de Chang et al. (1999) se alcanzó el 100% de conversión hasta tan sólo 10 mg L⁻¹. La explicación radica en que, mientras que el lodo utilizado en el presente trabajo presenta una estructura granular, el lodo

utilizado en el trabajo que comparamos proviene de digestores anaerobios municipales con estructura floculenta, constituida tanto por microorganismos como por partículas de deshecho. Este tipo de digestores pueden obtener velocidades elevadas de consumo de materia orgánica, pero son más sensibles a cambios en las condiciones operacionales y a la presencia de sustancias tóxicas.

Tabla 5.4: Parámetros cinéticos calculados para la eliminación de 246TCP.

Parámetro (mg 246TCP L ⁻¹ d ⁻¹)	246TCP (mg L ⁻¹)											
	3,3	6,6	10	20	50	75	100	110	120	130	150	200
V_o	1,6	1,4	2,3	2,7	5,9	4,8	3,5	3,5	3,3	3,3	1,6	0,9
V_{Max}	1,8	1,7	2,7	13,8	8,9	8,2	4,7	5	4,6	4,6	4,3	2,1

La tendencia de los parámetros de velocidad calculados indica un aumento inicial de sus valores hasta alcanzar un máximo, para posteriormente disminuir. Esta tendencia es típica en un proceso ajustable al modelo inhibitorio de Haldane (inhibición por sustrato). Este modelo se describe en el Capítulo 1.3 (Ecuación 1.14). Se considera constante la concentración de microorganismos, por lo que, al igual que en la Ecuación 5.1, las constantes μ_{max} , $Y_{X/S}$ y X_o se incluyen en V_{max} (mg 246TCP L⁻¹ d⁻¹).

$$V_s = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S + S \cdot \left(\frac{S}{K_I} \right)^n} \cdot X \quad [1.14]$$

Los valores de V_o , haciendo uso del método de las velocidades iniciales, se ajustaron a este modelo. En la Figura 5.12 se muestra el resultado de este ajuste. También se ajustó la evolución de la concentración de 246TCP para todas las concentraciones estudiadas, que se representa en la Figura 5.13 para concentraciones iniciales de hasta 20 mg 246TCP L⁻¹ (5.13a) y para el resto de concentraciones (5.13b). En la Tabla 5.5 se recogen los parámetros estimados con cada ajuste, así como los coeficientes de correlación. Se emplearon los mismos métodos de ajuste que los especificados en el estudio cinético de la inhibición de la metanogénesis acetoclástica y del consumo de DQO. La bondad de ajuste en ambos casos fue elevada ($R^2 = 0,996$ y $0,923$, respectivamente), aunque el ajuste de la evolución de las

concentraciones fue más exacto, debido tanto al coeficiente de correlación como al error relativo en la estimación de los parámetros.

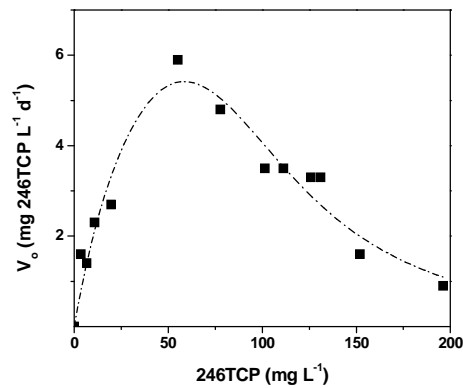


Figura 5.12: Ajuste de la velocidad inicial de eliminación de 246TCP al modelo de Haldane (Ecuación 1.12).

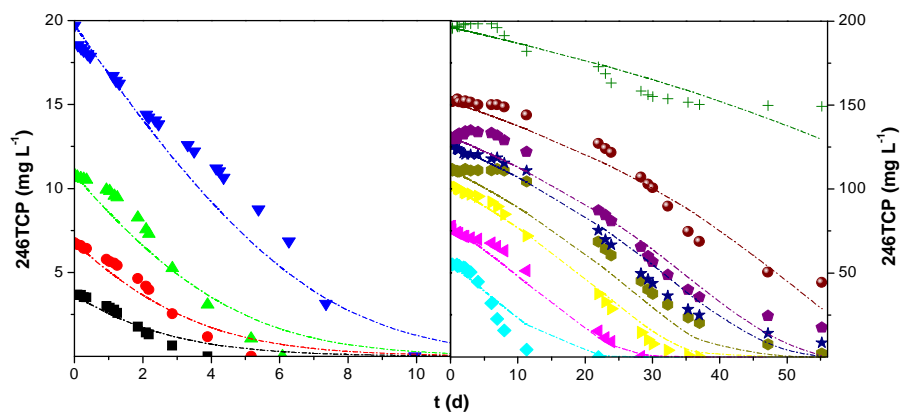


Figura 5.13: Ajuste de la evolución de la concentración de 246TCP al modelo de Haldane para concentraciones iniciales de 3,3 (■), 6,6 (●), 10 (▲), 20 (▼), 50 (◆), 75 (◀), 100 (▶), 110 (◈), 120 (★), 130 (◈), 150 (●) y 200 (+) mg 246TCP L⁻¹.

Se observa que los valores de los parámetros obtenidos con ambos métodos fueron ligeramente dispares, aunque dentro del intervalo de confianza (establecido en el 95% en

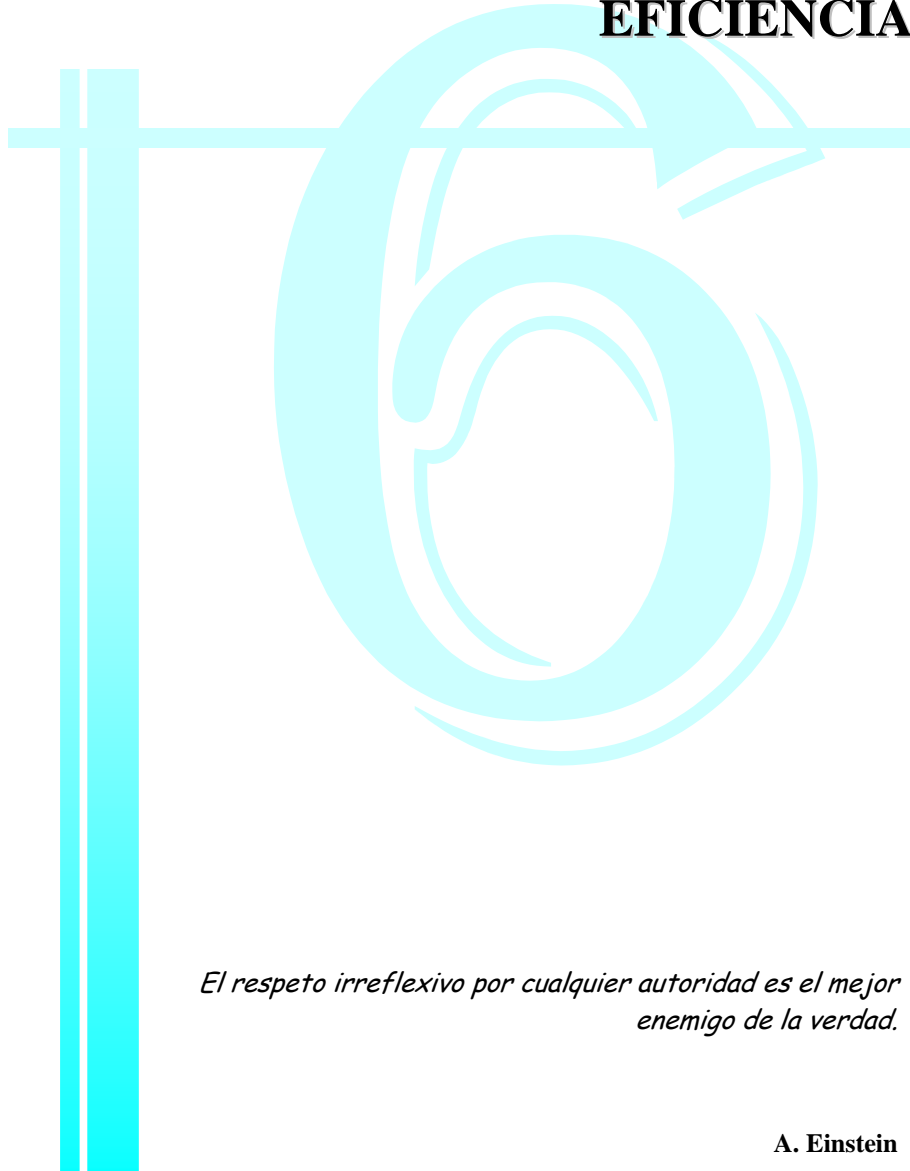
ambos casos) para todos ellos. Utilizar el método de las velocidades iniciales presentó la ventaja de poder representar los valores de las velocidades iniciales reales, sin tener en cuenta la fase de latencia detectada, aunque el hecho de obtener velocidades iniciales por regresión lineal lleva aparejado un cierto grado de error. Por otro lado, como se observa en la Figura 5.13, el método integral predice con bastante exactitud el itinerario de los puntos salvo durante los primeros días, ya que este modelo no tiene en cuenta el periodo de latencia antes mencionado. El parámetro más afectado por el hecho de no tener en cuenta este periodo en el método integral es la constante de saturación, ya que la desviación temporal provocada por la fase de latencia sitúa la velocidad máxima de degradación del 246TCP en concentraciones inferiores. Armentante et al. (1999) determinaron el valor de la constante de saturación en 1,3 mg 246TCP L⁻¹, aunque estos autores no tuvieron en cuenta efectos inhibitorios del tipo Haldane, y emplearon concentraciones muy inferiores a las del presente trabajo (10-20 mg L⁻¹), por lo que la evolución del 246TCP pudo haberse ajustado a un primer orden.

Tabla 5.5: Parámetros estimados del modelo de Haldane.

Método	Parámetros				
	V_{max} (mg 246TCP L ⁻¹ d ⁻¹)	K_s (mg 246TCP L ⁻¹)	K_i (mg 246TCP L ⁻¹)	n (adimensional)	R^2
<i>Velocidades iniciales</i>	11,2 ± 5,6	46,3 ± 36,2	91,5 ± 30,4	2,9 ± 0,9	0,926
<i>Integral</i>	11,7 ± 3,3	9,1 ± 3,2	106,0 ± 2,4	2,2 ± 0,1	0,996

CAPÍTULO 6

BIODEGRADACIÓN DE 246TCP CON REACTORES ANAEROBIOS DE ALTA EFICIENCIA



*El respeto irreflexivo por cualquier autoridad es el mejor
enemigo de la verdad.*

A. Einstein

Resumen

Se ha estudiado la degradación anaerobia de 246TCP en reactores de lecho granular expandido (EGSB) y de lecho fluidizado (FBBR). Los reactores EGSB se inocularon con lodo granular, mientras que se empleó carbón activo como soporte para los microorganismos en el FBBR. Este reactor y un reactor EGSB (denominado EGSB-Bio) se bioaumentaron en discontinuo durante 12 d con tres cepas del género *Desulfitobacterium* (*D. hafniense* PCP1, *D. hafniense* TCPA y *D. chlororespirans*), funcionando otro reactor EGSB como control (EGSB-C). Tras la bioaumentación, se trabajó en continuo incrementando progresivamente la velocidad de carga de 246TCP hasta $250 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. La eficiencia de degradación primaria de 246TCP se mantuvo en torno al 100% en los tres reactores hasta velocidades de carga en torno a $200 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, para disminuir para cargas superiores principalmente en el reactor EGSB-C. La eficiencia de decoloración, en cambio, aumentó progresivamente hasta alcanzar valores en torno al 20 y 40% para los reactores EGSB-C y EGSB-Bio, respectivamente. En el reactor FBBR, la eficiencia de decoloración se estabilizó en valores en torno al 55% tras la saturación del carbón activo. El principal intermedio de degradación detectado fue el 4CP, lo que permite afirmar que la decoloración de 246TCP sucedió esencialmente por vía *orto*. La eficiencia de consumo de DQO disminuyó con el aumento de velocidad de carga de 246TCP, en mayor medida en el reactor EGSB-C, aunque se situó en todo momento en valores superiores al 75%, lo que da idea de la estabilidad mostrada de los reactores. La producción de metano en los reactores EGSB varió entre 0,25 y $0,75 \text{ g CH}_4\text{-DQO g}^{-1}$ durante los periodos de aumento de velocidad de carga de 246TCP, siendo esta ligeramente superior en el reactor EGSB-Bio. Finalmente, los reactores se sometieron a situaciones de toxicidad extrema durante periodos cortos de tiempo, mediante un aumento en la velocidad de carga de 246TCP y un pulso de toxicidad. En ambas pruebas se encontró que el reactor FBBR soportó mejor estas variaciones extremas que los reactores EGSB. Asimismo, el reactor EGSB-Bio mostró mejores síntomas de recuperación que el EGSB-C, lo que hace pensar que la bioaumentación mejoró la estabilidad del sistema.

6.1 Introducción

El 246TCP es un compuesto utilizado como preservante de la madera, cuero y artículos textiles. Asimismo, se utiliza como precursor en la fabricación de 2346TeCP y PCP (Chang et al., 1995). Puede aparecer en los procesos de cloración de pulpa de papel junto a otros compuestos orgánicos halogenados hasta concentraciones de 200 mg L⁻¹ (Savant et al., 2006).

Existen dos estrategias para acelerar la degradación de clorofenoles en condiciones anaerobias. La **bioestimulación** de comunidades metanogénicas, a través de la modificación de las condiciones de cultivo, ya sea mediante el uso de cosustratos y sales en concentraciones óptimas, o la selección del pH y temperatura adecuados, y mediante la adición de concentraciones no inhibitorias de clorofenoles en medios anaerobios biodegradables, permite el enriquecimiento de estas comunidades en bacterias capaces de realizar halorespiración (Breitenstein et al., 2001). La bioestimulación puede ir enfocada a la degradación de posiciones específicas del anillo fenólico si se enriquece en clorofenoles menos clorados que el clorofenol objetivo, como ocurre en la degradación de 246TCP mediante cultivos enriquecidos en 24DCP y 34DCP para la dechloración de posiciones *orto* y *para* (Chang et al., 1999). También puede enriquecerse en clorofenoles más clorados que el clorofenol objetivo para bioestimar de manera inespecífica el consorcio metanogénico, como ocurre con el enriquecimiento en PCP para la dechloración de 246TCP (Kennes et al., 1996). Mediante la **bioaumentación** con cepas halorespiradoras se pueden obtener rendimientos de dechloración elevados desde la puesta en marcha del reactor, reduciendo significativamente el periodo de aclimatación y permitiendo trabajar con cargas de clorofenol relativamente elevadas desde el principio de la operación (Christiansen y Ahring, 1996; Tartakovsky et al., 1999).

El género *Desulfitobacterium* es el táxon halorespirador más estudiado (Villemur et al., 2006). Se han aislado cepas de este género provenientes de suelos contaminados (Sanford et al., 1996), sedimentos de río (Utkin et al., 1994) y reactores anaerobios que tratan aguas residuales que contienen compuestos aromáticos halogenados (Bouchard et al., 1996). Este género es capaz de dechlorar posiciones *orto*, *meta* y *para* del anillo fenólico (Bouchard et al., 1996) y puede utilizar diversos compuestos orgánicos como dadores de electrones, como

piruvato, lactato o H_2 (Villemur et al., 2006), lo que le confiere una gran versatilidad. Se ha utilizado para bioaumentar reactores UASB (Tartakovsky et al., 1999; Lanthier et al., 2002) y FBBR (Lanthier et al., 2005) en la degradación anaerobia de clorofenoles, mostrando gran capacidad de adaptación.

Entre los tratamientos anaerobios de clorofenoles, los reactores más utilizados han sido los de tipo UASB (Atuanya et al., 2000; Gardin et al., 2001; Bali y Sengul, 2003; Collins et al., 2005; Shen et al., 2005a; Ye y Li, 2007; Majumder y Gupta, 2008; Sponza y Ulukoy, 2008) y FBBR (Puhakka et al., 1995; Suidan et al., 1996; Tsuno et al., 1996; Khodadoust et al., 1997; Koran et al., 2001; Garibay-Orijel et al., 2006). El empleo de reactores EGSB permite alcanzar eficiencias de degradación de 246TCP cercanas al 100% para velocidades de carga de 246TCP de $25 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ tras 320 d de operación en condiciones psicrófilas (Collins et al., 2005). Por otro lado, al operar con reactores FBBR hay que tener en cuenta la capacidad adsorptiva del soporte utilizado, sobre todo si se trata de carbón activo u otro soporte de elevada área superficial. Koran et al. (2001) alcanzaron una eficiencia de eliminación de naftaleno en un FBBR con carbón activo en torno al 94%, de la que alrededor del 37% se debió exclusivamente a fenómenos de adsorción. Khodadoust et al., (1997) emplearon el mismo sistema en la degradación de PCP, observando que el 95% de PCP fue transformado en cantidades equimolares de 3CP y 4CP, que se adsorbieron en la superficie del carbón activo hasta alcanzar la rotura del equilibrio de adosorción.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el tratamiento de 246TCP empleando reactores EGSB y FBBR. Se ha estudiado el efecto de la bioaumentación de los reactores con cepas del género *Desulfitobacterium* y se ha comparado la eficiencia de los mismos en la degradación de 246TCP, en la dechloración, en el consumo de DQO y en la metanogénesis. Asimismo, se estudió el equilibrio de adsorción de 246TCP sobre carbón activo, el cual ha sido modelizado a partir de un balance de materia en el reactor FBBR. Finalmente, se ha evaluado el comportamiento de los reactores al someterlos a condiciones de toxicidad extremas con velocidades de carga de 246TCP relativamente elevadas.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Configuración de los reactores

El estudio se realizó en continuo a 30 ± 1 °C en 3 reactores tipo UASB descritos en el Capítulo 2. Dos de ellos se operaron como reactores EGSB y el tercero como reactor de lecho fluidizado con biopelículas (FBBR), el cual se muestra en la Figura 6.1. En este sistema se añadió 1 kg de carbón activo (MERCK) como soporte para la formación de biopelículas, con un diámetro equivalente entre 2-4 mesh, volumen de poro de $0,36 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ y área superficial de $622 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. En la base del reactor se ubicó un lecho de cantos rodados de 5 mm de diámetro, recubierto de rejillas de aluminio de 0,2 mm de diámetro de poro para homogeneizar la entrada al reactor. El carbón activo se emplazó en el interior de un filtro manga de nylon de 0,1 mm de diámetro de poro con el objetivo de evitar la pérdida de carbón por lavado. Se empleó una bomba peristáltica de caudal variable (Ismatec Ecoline) para fluidizar el lecho, que proporcionó una velocidad ascensional de 10 m h^{-1} , lo que se tradujo en una expansión aproximada del lecho del 50%. Las muestras se tomaron en la parte superior de los reactores, se filtraron y se congelaron a -20 °C hasta su análisis. El metano se cuantificó únicamente en los reactores EGSB, empleando el mismo método descrito en el Capítulo 2.

6.2.2 Fuente de biomasa

Los reactores EGSB se inocularon con 100 g SSV de una mezcla de dos lodos (1:1 en relación másica). El primero de ellos se extrajo de un reactor EGSB adaptado al tratamiento de 24DCP (Capítulo 2) con un diámetro entre 1 y 2 mm y una SMA de $0,61 \text{ g CH}_4\text{-DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$. El segundo se obtuvo de una industria de reciclaje de pulpa de papel, con un diámetro de 1,5-2 mm y una SMA de $0,46 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$.

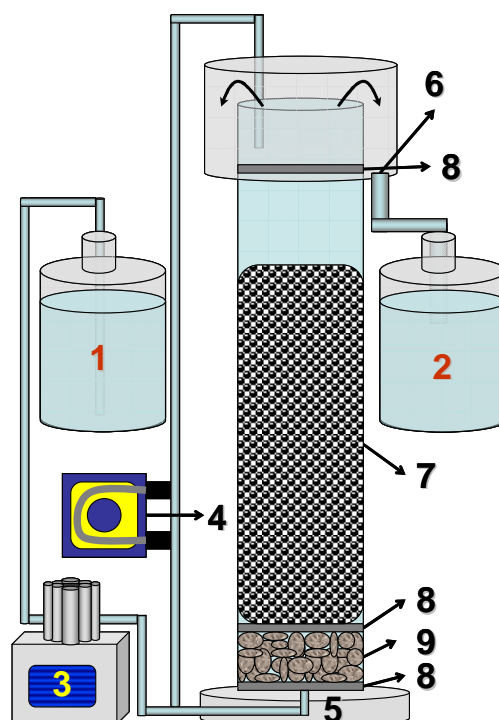


Figura 6.1: Esquema del FBBR. Clave: 1. Influyente 2. Efluente 3. Bomba de entrada 4. Bomba de recirculación 5. Entrada 6. Salida 7. Lecho de carbón activo 8. Rejillas 9. Lecho de cantos rodados.

6.2.3 Bioaumentación

Uno de los reactores EGSB (EGSB-Bio) y el reactor FBBR se bioaumentaron con el objetivo de mejorar la eficiencia decloradora del consorcio metanogénico, empleando tres cepas del género *Desulfitobacterium*: *D. hafniense* PCP-1 (DSMZ-12420), *D. hafniense* TCP-A (DSMZ-13557) y *D. chlororespirans* (DSMZ-11544). Se empleó el medio DSMZ-663 para el crecimiento de las cepas, formado por los siguientes compuestos: Macronutrientes [mg L^{-1}] (KH_2PO_4 [5440], $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [180], $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [32], NH_4Cl [500], Extracto de levadura [1000], Resarzurina [0,5]), Piruvato sódico [2500], $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [2000], Cisteína- $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ [400], $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ [400], vitaminas [$\mu\text{g L}^{-1}$] (Biotina [2000], Tiamina- $\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [5000], Vitamina B12 [100]) y micronutrientes [$\mu\text{g L}^{-1}$] (NTA –ácido nitrilo triacético- [64000],

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [6750], $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [500], $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [120], $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [500], ZnCl_2 [500], $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [125], H_3BO_3 [50], $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [120], NaCl [5000], $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [600], $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [130]). El medio se preparó añadiendo por separado los macronutrientes, en una disolución previamente esterilizada en autoclave, y disoluciones de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, piruvato sódico, cisteína- $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, vitaminas y micronutrientes, que se esterilizaron por filtración utilizando filtros Whatman micropore de 0,2 μm . Tanto las disoluciones como el medio mezcla se prepararon en condiciones anaerobias ($\text{N}_2:\text{CO}_2$ 80:20 v/v). La disolución de micronutrientes se preparó disolviendo inicialmente el NTA, ajustando el pH a 7,5 con KOH 1M y añadiendo posteriormente las sales. Las condiciones de cultivo fueron: 37 °C, pH = 7,5 y 140 rpm en oscuridad. En la Figura 6.2 se muestra la evolución de la concentración de las tres cepas durante el cultivo.

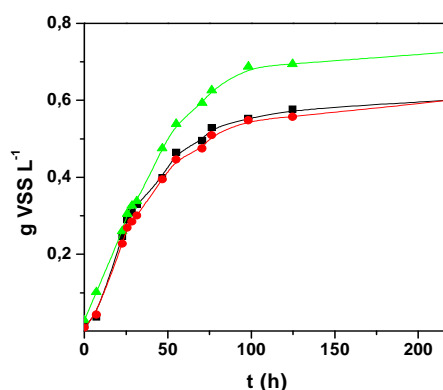


Figura 6.2: Cinética de crecimiento de las cepas *D. hafniense* PCP-1 (■), *D. hafniense* TCP-A (●) y *D. chlororespirans* (▲).

6.2.4 Preparación del agua residual sintética

El 246DCP (Sigma-Aldrich) se disolvió en NaOH 0,2 M hasta una concentración de 10 g L⁻¹, tomándose alícuotas de esta disolución para preparar el agua residual sintética. El medio basal, constituido por macro y micronutrientes, se preparó de la misma manera que está descrito en el Capítulo 2. Este medio se suplementó con una fuente de carbono consistente en

sacarosa, etanol y extracto de levadura en relación de DQO 3:2:0,1 y con la disolución de 24DCP. Se añadió bicarbonato sódico a razón de 1 g $\text{NaHCO}_3 \text{ g}^{-1}$ DQO como fuente de alcalinidad y para mantener el pH en el intervalo 7,0-7,5. El agua sintética se burbujeó con una mezcla 80:20 (v/v) de $\text{N}_2:\text{CO}_2$ para eliminar el oxígeno residual, y se almacenó a 4 °C, siendo alimentada a los reactores inmediatamente después de su preparación para evitar procesos de fermentación.

6.2.5 Experimentos en continuo

El diseño de los experimentos en continuo se presenta en la Tabla 6.1. Los reactores EGSB se activaron sin 246TCP, empleando una VCO entre 3 y 8 g DQO $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Tras alcanzar condiciones estacionarias, los reactores EGSB-Bio y el FBBR se bioaumentaron con *D. hafniense* PCP1, *D. hafniense* TCP-A y *D. chlororespirans*, dejando el otro reactor EGSB como control (EGSB-C). Para ello se inocularon los reactores con 350 mL de cada cepa crecidas en el medio descrito anteriormente y en estado de crecimiento exponencial (concentraciones de cada cepa: 0,63, 0,62 y 0,73 g SSV L^{-1} , respectivamente). Durante el periodo de bioaumentación los reactores trabajaron en discontinuo con el objetivo de permitir el establecimiento de estos microorganismos tanto en el lodo granular como en las biopelículas formadas sobre el carbón activo. La duración del periodo de bioaumentación fue de 12 d, en los que se suministró de macro y micronutrientes, bicarbonato y fuente de carbono a razón de 7,5 g DQO L^{-1} y 10 mg L^{-1} de 246TCP con objeto de aclimatar la biomasa al compuesto tóxico. La alimentación tuvo lugar con periodicidad diaria para equiparar el funcionamiento a un t_{HR} de 24 h y trabajar con una VCO de 7,5 g DQO $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Al finalizar el periodo de bioaumentación, se trabajó en continuo durante el resto del experimento, empleando una VCO inicialmente de 7,5 g DQO $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, que fue disminuida en el transcurso del experimento a 3,75 g DQO $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Se empleó un t_{HR} de 24 h y se ensayaron velocidades de carga de 246TCP crecientes entre 10 y 250 mg $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. El tiempo total del experimento en continuo fue de 248 d.

Tabla 6.1: Condiciones de operación en los reactores EGSB-C, EGSB-Bio y FBBR durante el periodo de estudio.

Fase	Periodo (d)		VCO ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	246TCP ($\text{mg L}^{-1} / \mu\text{M}$)
	EGSB	FBBR		
Puesta en marcha	- (54)	-	3-8	0 / 0
Bioaumentación	- (12)	- (12)		10 / 51
	0	0		10 / 51
	15	15	7,5	20 / 102
	22	22		30 / 152
	43	43		40 / 203
Operación en continuo	58	58		50 / 254
	82	82		60 / 305
	98	98		70 / 355
	117	117		80 / 406
	125	151	3,75	100 / 508
	146	173		125 / 635
	167	194		150 / 761
	187	214		200 / 1015
	202	229		250 / 1269
Tiempo total (d)	221	248		

6.2.6 Estudios de adsorción del 246TCP sobre carbón activo

Se realizaron estudios de adsorción de 246TCP sobre carbón activo en discontinuo empleando carbón activo nuevo y carbón activo extraído del FBBR al finalizar el periodo de estudio en continuo, el cual contenía una biopelícula madura. El carbón activo con biopelícula se esterilizó previamente con 4% formaldehído en PBS durante 24 h a 4 °C y pH = 7, y se lavó con acetonitrilo: PBS 50:50 v/v a pH 7 para extraer los clorofenoles adsorbidos y evitar la desintegración de la biopelícula. Los estudios se realizaron por duplicado en botellas de suero de 250 mL a las que se añadieron concentraciones de carbón activo de 0,5 g L⁻¹ y 2 g L⁻¹. Se ensayaron concentraciones de 246TCP entre 10 y 500 mg L⁻¹ con la misma agua residual sintética empleada en los ensayos en continuo. El ensayo se complementó con dos blancos por triplicado a los que se les añadió 100 mg 246TCP L⁻¹, uno de ellos con carbón activo pero en PBS a pH 7, y el otro sin carbón activo pero empleando el agua residual sintética. Todos los ensayos se realizaron a 30 °C bajo condiciones anaerobias (N₂:CO₂ 80:20 v/v) en agitación a 40 rpm. Para verificar los ensayos, al final de los mismos se extrajo el 246TCP con

acetonitrilo en tres lavados con agitación a 180 rpm y a 30 °C. La eficiencia de extracción fue superior al 95% en todos los casos.

6.2.7 Estudios de toxicidad extrema

Al finalizar el periodo de operación en continuo en sendos reactores se realizó un experimento consistente en someter los reactores a condiciones de toxicidad extremas durante un periodo de tiempo relativamente corto. El estudio se dividió en dos ensayos. En el primero de ellos se aumentó la velocidad de carga de 246TCP durante 22 h desde 250 hasta 1000 mg L⁻¹ d⁻¹ (*toxicidad por aumento de velocidad de carga*), mientras que el segundo se añadió un pulso de 1000 mg 246TCP L⁻¹ mediante la adición de 0,42 L de 246TCP con 10.000 mg L⁻¹ en NaOH 0,1 M, trabajando con una velocidad de carga de 250 mg 246TCP L⁻¹ d⁻¹ (*toxicidad por pulso tóxico*). El experimento tuvo como objetivo comparar la estabilidad de los reactores bajo condiciones extremas. En el primer ensayo se pretende averiguar el comportamiento de los microorganismos sometidos a un aumento extremo de carga sostenido, mientras que en el segundo se pretende evaluar la resistencia de los mismos a un pulso específico. Entre ambos ensayos los reactores fueron sometidos a un periodo de recuperación de 15 d mediante la aplicación de velocidades de carga de 250 mg 246TCP L⁻¹ d⁻¹ para retomar condiciones estacionarias.

6.2.8 Métodos analíticos

El análisis de la DQO total y soluble, así como de los SST y SSV, se realizó de acuerdo al [APHA Standard Methods \(1992\)](#). La concentración de 246TCP y sus intermedios de reacción se cuantificaron mediante HPLC-UV utilizando el mismo método descrito en el Capítulo 4.

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Activación de la biomasa

La Figura 6.3 muestra el funcionamiento de los reactores EGSB-C y EGSB-Bio durante el periodo de activación de la biomasa. Se puede considerar que este periodo tuvo una duración en torno a 54 d, momento en el que se alcanzaron condiciones estacionarias. El lodo adquirió una elevada estabilidad fisiológica, dado que la eficiencia de consumo de DQO alcanzada estuvo en torno al 90%, mientras que la eficiencia metanogénica se situó en valores entre 50-60 g CH₄-DQO g⁻¹ DQO.

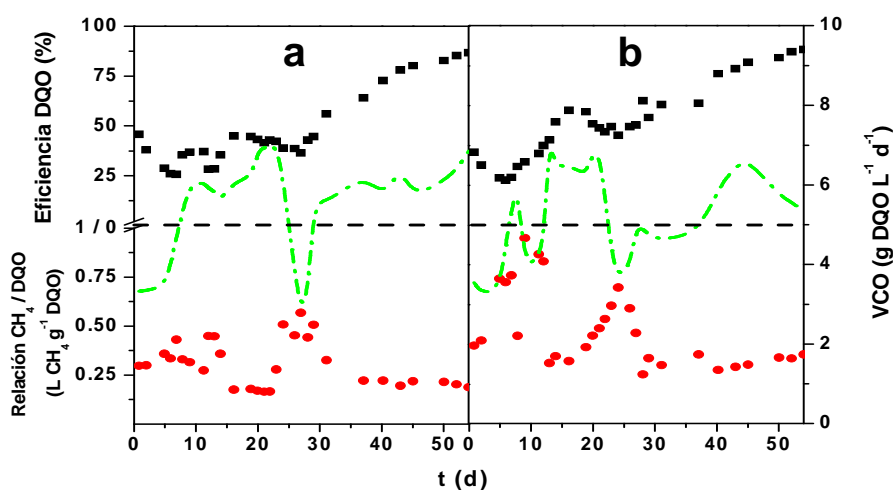


Figura 6.3: Evolución de la eficiencia de DQO (■) y la relación CH₄ producido respecto a la DQO consumida (●), así como de la VCO aplicada (— · —) durante la etapa de puesta en marcha de los reactores EGSB-C (a) y EGSB-Bio (b).

6.3.2 Operación de los reactores en continuo

6.3.2.1 Reactor EGSB-C

En la Figura 6.4 se presenta la evolución de la concentración molar de 246TCP en el influente y efluente y de sus principales intermedios de degradación durante el periodo de estudio en continuo. Como puede apreciarse, la concentración molar de 4CP en el efluente prácticamente coincide con la concentración molar de 246TCP en el influente, lo que significa que apenas hubo degradación de 4-CP formado durante gran parte del proceso. En los últimos días de operación (a partir del día 192) los valores de concentración de 4CP comienzan a estar por debajo de los valores de entrada de 246TCP, lo que indica una degradación parcial del 4CP formado a partir de velocidades de carga de 246TCP en torno a $200 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, consecuencia de una posible adaptación del lodo a la deoloración del 4CP.

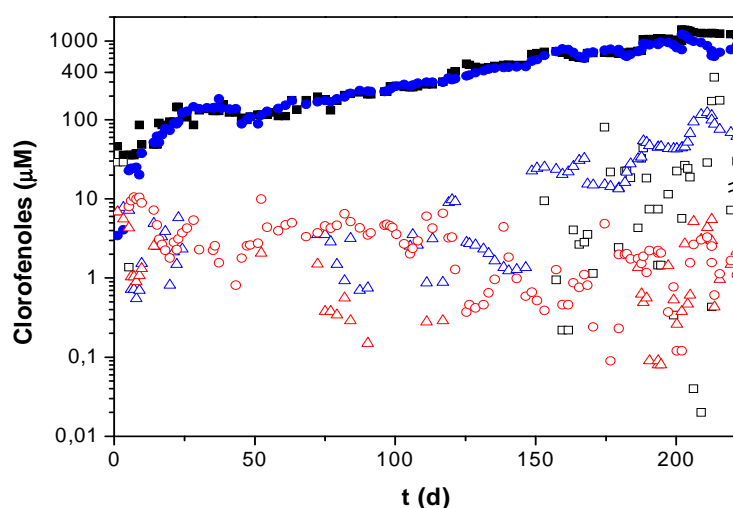


Figura 6.4: Evolución de la concentración molar del 246TCP en la entrada (■) y en la salida (□), así como de los intermedios de deoloración en posición *orto*: 24DCP (△), 4CP (●) y *para*: 26DCP (△), 2CP (○) en el reactor EGSB-C. Nótese la escala logarítmica.

La aparición de pequeñas concentraciones de 2CP y 26DCP, productos derivados de la *para*-decloración de 246TCP, sobre todo al principio del proceso, indica que los microorganismos degradaron el 246TCP por ambas vías, prevaleciendo mayormente la vía *orto*. La generación de 24DCP en etapas tardías del proceso (día 125 en adelante), para velocidades de carga de 246TCP por encima de $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (ver Tabla 6.1), indica que la *orto*-decloración del 246TCP hasta 4CP no fue completa, y este hecho se agravó tras incrementar la velocidad de carga de 246TCP (días 167, 187 y 202), aunque en los tres casos la concentración de 24DCP disminuyó ligeramente en los días posteriores a los aumentos de carga, probablemente debido a fenómenos adaptativos. La explicación de este hecho no sólo radica en la inhibición de la biomasa debido a la presencia del 24DCP y el 246TCP. Esta inhibición puede estar agravada debido a fenómenos de inhibición competitiva (Magar et al., 1999), probablemente porque ambos sustratos (246TCP y 24DCP) compiten por el centro activo de las *orto*-clorofenol deshalogenasas implicadas en el proceso (Villemur et al., 2006).

En la Figura 6.5 se recoge la evolución en la eficiencia de decloración en el reactor EGSB-C. Los valores de eficiencia de decloración se calcularon como porcentaje molar de la suma de todos los clorofenoles en la salida respecto a la cantidad molar de 246TCP en el influente. En los momentos iniciales del proceso esta eficiencia estuvo en torno al 35%, disminuyendo durante los siguientes 50 d hasta valores prácticamente nulos. Este hecho puede deberse a procesos de decloración cometabólicos y abióticos, típicos de lodos no adaptados. Lógicamente, a medida que se va aumentando la velocidad de carga de 246TCP, la importancia de estos procesos va disminuyendo hasta quedar como reacciones residuales. Además, durante los primeros días los valores de eficiencia de decloración pudieron haber sido modificados por procesos de adsorción de los clorofenoles sobre el lodo anaerobio. Shen et al. (2005) estimaron que durante el tratamiento de PCP con reactores UASB la desaparición de en torno a $4 \text{ mg de PCP g}^{-1} \text{ SSV}$ fue debida a procesos de adsorción. Finalmente, la eficiencia de decloración comenzó a aumentar paulatinamente a partir del día 120 en adelante hasta alcanzar un máximo del 25% casi al final del proceso. Es de suponer que si el proceso hubiese continuado durante más días, la eficiencia de decloración habría aumentado.

En cuanto a la eficiencia de degradación de DQO, en la Figura 6.6 se muestra la evolución de la DQO en la entrada y en la salida, así como la VCO. Durante los dos primeros meses se trabajó con una VCO en torno a $7,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, para posteriormente bajar la carga

hasta aproximadamente la mitad, lo que se mantuvo durante el resto del ensayo. Esta disminución en la VCO se debió a la necesidad de trabajar en las mismas condiciones que el reactor FBBR. Puede verse que la DQO de salida del reactor se situó durante casi todo el ensayo por debajo de 1 g L^{-1} , lo que invita a pensar que la eficiencia de degradación de DQO se vio ligeramente afectada por la presencia de 246TCP. Este hecho se puede observar en la Figura 6.7, en la que se muestra la evolución de las eficiencias de degradación de 246TCP y de DQO en función de la carga de 246TCP aplicada.

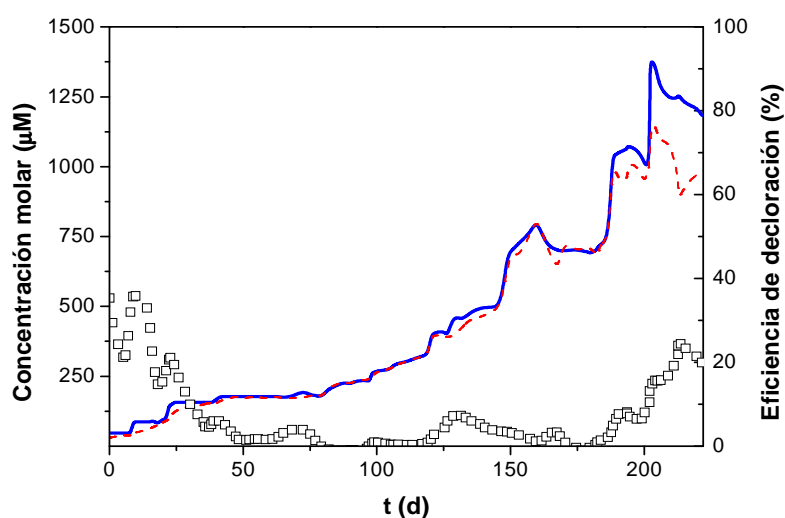


Figura 6.5. Evolución de la concentración molar de clorofenoles en la entrada (línea azul continua) y salida (línea roja discontinua), así como de la eficiencia de dechloración (\square) en el reactor EGSB-C.

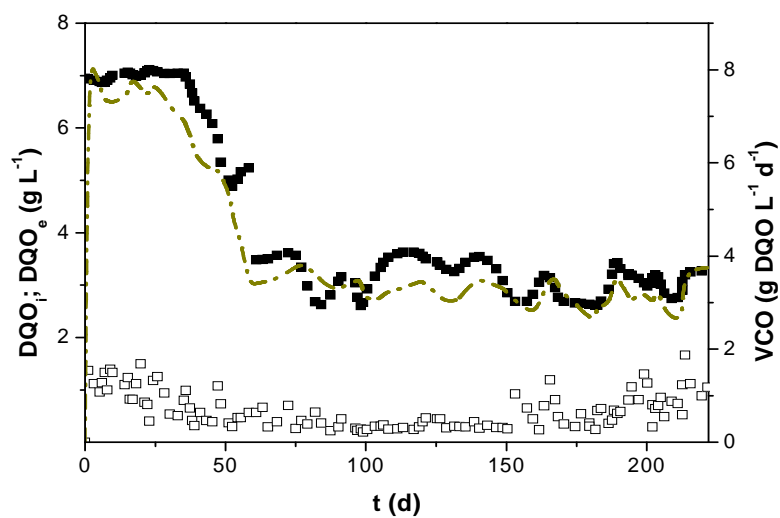


Figura 6.6: Evolución de la DQO en la entrada (■) y en la salida (□), así como de la VCO (línea discontinua) en el reactor EGSB-C.

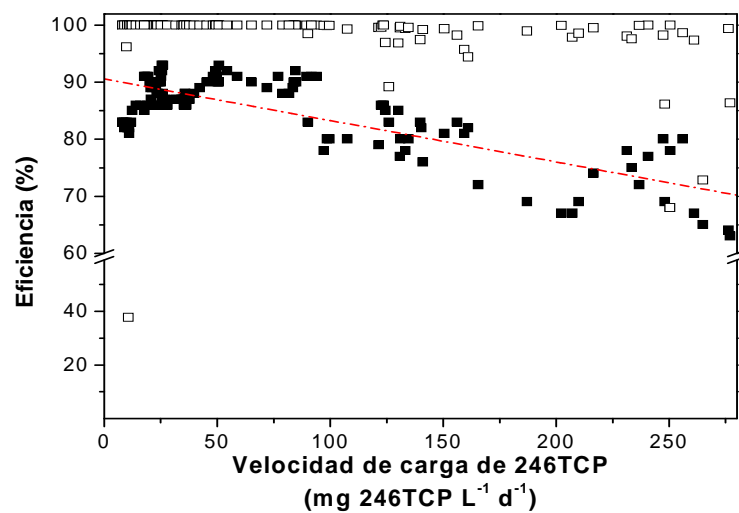


Figura 6.7: Eficiencia de eliminación de DQO (■) y de 246TCP (□) frente a la velocidad de carga de 246TCP. Ajuste lineal (línea roja discontinua) en el reactor EGSB-C

La disminución de la eficiencia de degradación de DQO está relacionada con el aumento de velocidad de carga de 246TCP, de forma que un aumento de carga de 100 mg 246TCP L⁻¹ d⁻¹ supuso una disminución de la eficiencia en torno al 7%. [Gardin et al. \(2001\)](#) alcanzaron cargas de 246TCP de 100 mg L⁻¹ d⁻¹ en un reactor UASB con aeración limitada, trabajando con una concentración de biomasa similar a la empleada en el presente estudio. En las cargas más elevadas, obtuvieron rendimientos de consumo de DQO del 80% trabajando con VCO de 0,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹. Estos rendimientos son similares a los obtenidos en el presente estudio trabajando, lo que parece indicar que el aumento de VCO no afecta el rendimiento de consumo de DQO entre 0,5-4 g DQO L⁻¹ d⁻¹.

En la Figura 6.8 se muestra la evolución de la producción de metano, así como la relación existente entre el CH₄ producido y la DQO consumida. La metanogénesis se vio afectada de manera similar a la degradación de la DQO por la carga de 246TCP administrada. El hecho de que la relación entre el CH₄ producido y la DQO consumida no sufriese modificaciones notables a lo largo de todo el proceso, con valores entre 0,2 – 0,45 g CH₄-DQO g⁻¹ DQO, corrobora este dato.

Empleando cargas de 24DCP de 232 mg L⁻¹ d⁻¹, [Sponza y Ulukoy \(2008\)](#) obtuvieron relaciones medias entre metano producido y DQO consumida de 0,25 g CH₄-DQO g⁻¹ DQO en reactores UASB, valores significativamente inferiores a los obtenidos en este trabajo. Cabe destacar que el 246TCP es más tóxico para los organismos metanogénicos que el 24DCP ([Jin y Bhattacharya, 1996](#)), por lo que las diferencias encontradas muestran que en los reactores EGSB la comunidad metanogénica es más estable y soporta mejor altas velocidades de carga de clorofenoles. La explicación radica en que la actividad de la biomasa es similar en toda la columna debido a la elevada relación entre el caudal de recirculación y el caudal de entrada. Sin embargo, la actividad de clorofenol de un consorcio metanogénico en presencia de PCP en un reactor UASB está estratificada en altura, siendo máxima en la base del reactor ([Shen et al., 2005](#)), precisamente donde existe la mayor concentración de clorofenol y, por tanto, donde se producen en mayor medida los fenómenos inhibitorios.

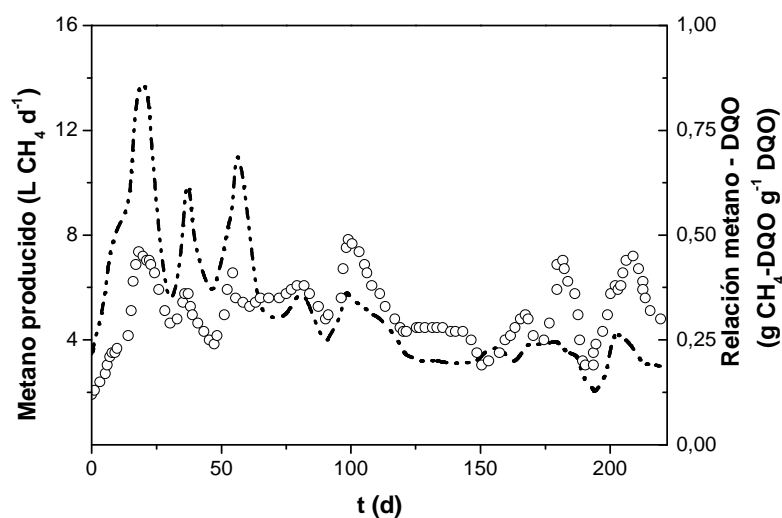


Figura 6.8: Producción de CH_4 (línea discontinua) y relación entre el CH_4 producido y la DQO consumida (\circ) en el reactor EGSB-C.

6.3.2.2 Reactor EGSB-Bio

La evolución de la concentración molar del 246TCP y de sus intermedios de reacción en el reactor EGSB-Bio se muestra en la Figura 6.9. De la misma forma que sucedió con el reactor EGSB-C, el principal intermedio de reacción fue el 4CP, por lo que el proceso transcurrió mayoritariamente por vía *orto*.

Cabe destacar que el 24DCP apareció a velocidades de carga de 246TCP por encima de $80 mg L^{-1} d^{-1}$, aunque en concentraciones molares muy inferiores al 4CP (<5% del 4CP), lo que indica que la transformación de 246TCP a 4CP fue superior al 95% durante todo el periodo de estudio. En cuanto a los intermedios de reacción propios de la *para*-decloración (26DCP y 2CP), cabe mencionar que su concentración fue relevante durante el primer mes de operación, probablemente coincidiendo con el tiempo de adaptación a la *orto*-decloración de las diferentes cepas *Desulfitobacterium* con las que el reactor fue bioaumentado. Hay que tener en cuenta que una de ellas, *D. hafniense* PCP-1, está capacitada para realizar decloración en posición *para*, aunque el proceso es menos favorable (Bouchard et al., 1996).

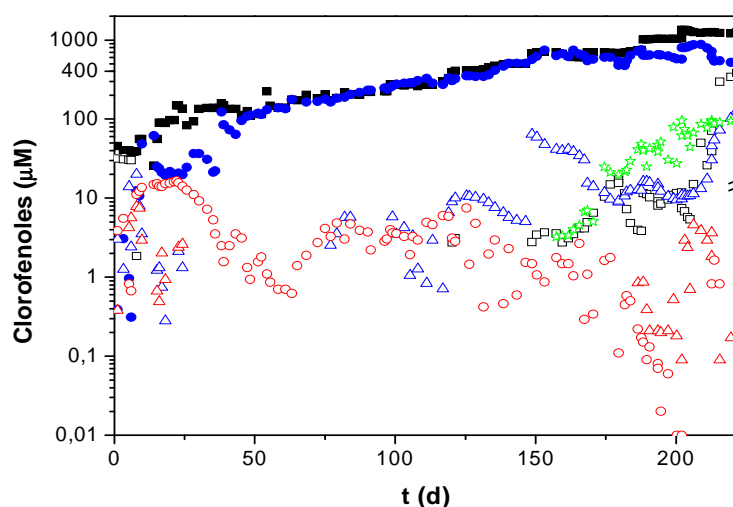


Figura 6.9: Evolución de la concentración molar del 246TCP en la entrada (■) y en la salida (□), así como de los intermedios de decoloración en posición *orto*: 24DCP (Δ), 4CP (●) y *para*: 26DCP (Δ), 2CP (○), y fenol (★) en el reactor EGSB-Bio. Nótese la escala logarítmica.

También merece la pena mencionar la aparición de fenol a partir del día 150 de operación, lo que indica que la microbiota se fue adaptando progresivamente al 4CP. Esta afirmación está reforzada por el hecho de que la eficiencia de decoloración (Figura 6.10) empezó a aumentar cuando comenzó a cuantificarse fenol en los efluentes, hasta un valor próximo al 40%. Estudios recientes han mostrado eficiencias de eliminación de 4CP y 2CP superiores al 90% en reactores UASB hasta velocidades de carga de $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Majumder y Gupta, 2008) y $693 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Bajaj et al., 2008) para 4CP y 2CP, respectivamente. Por otra parte, hay que destacar que durante los primeros días de operación, hasta aproximadamente el día 25, la eficiencia de decoloración llegó a alcanzar valores en torno al 75%, significativamente mayores que los registrados durante el mismo periodo de tiempo en el reactor EGSB-C.

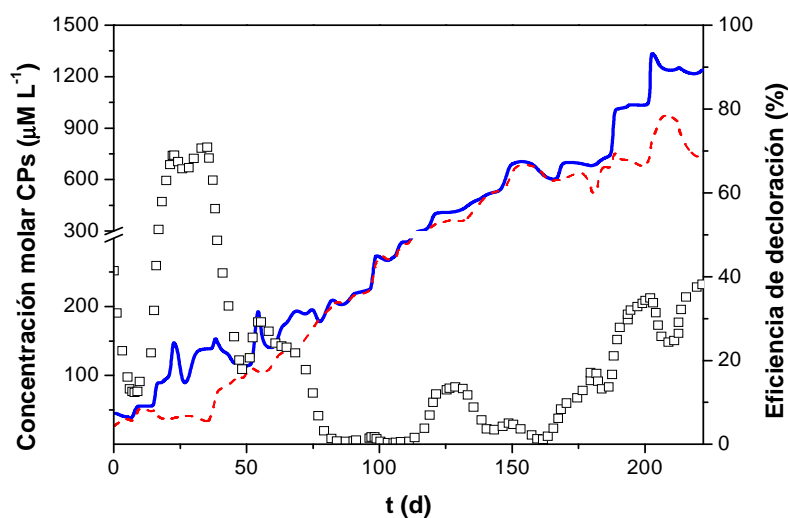


Figura 6.10. Evolución de la concentración molar de clorofenoles en la entrada (línea azul continua) y salida (línea roja discontinua), así como de la eficiencia de dechloración (\square) en el reactor EGSB-Bio.

En la Figura 6.11 se muestra la evolución de la DQO en la entrada y salida del reactor, así como la VCO aplicada al reactor EGSB-Bio. La eficiencia de degradación de DQO se situó durante casi todo el experimento valores superiores al 70%. A partir del día 175, operando con velocidades de carga superiores a $150 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, se observa una cierta inestabilidad, con eficiencias en torno al 60-65%. Esta disminución de la eficiencia de consumo de DQO está relacionada con el aumento en la velocidad de carga de 246TCP. En la Figura 6.12 se muestra la eficiencia de consumo de DQO y eliminación de 246TCP en función de la carga de 246TCP aplicada. La inhibición en el consumo de DQO calculada indica que un aumento de $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en la velocidad de carga de 246TCP provoca una disminución en la eficiencia de consumo de DQO en torno al 6%. Centrando la atención en esta figura, hay que valorar que la eficiencia de biodegradación primaria de 246TCP se mantuvo durante casi todo el experimento en valores próximos al 100%, aunque trabajando con velocidades de carga superiores a $200 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ se dieron días de ligera inestabilidad.

Esto implica que la inhibición detectada en el consumo de DQO debió afectar en mucha menor magnitud a los microorganismos decoloradores de 246TCP.

En la Figura 6.13 se muestra la evolución en la producción de CH_4 y la relación entre el CH_4 producido y la DQO consumida en el reactor EGSB-Bio. La producción de metano se mantuvo en valores entre 10 y 12 L d^{-1} empleando VCO en torno a 7,5 $\text{g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mientras que tras la disminución de ésta hasta 3,75 $\text{g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ se registraron producciones entre 4-6 $\text{L CH}_4 \text{ d}^{-1}$. Se observa que existieron periodos en los que esta producción disminuyó para recuperarse posteriormente, coincidiendo con aumentos en la velocidad de carga de 246TCP. En el periodo final del experimento, en torno al día 200, la producción de metano experimentó una ligera caída hasta un valor en torno a 3 L d^{-1} , coincidiendo de nuevo con la máxima velocidad de carga de 246TCP aplicada. Se observa que la producción de CH_4 sufrió una disminución paralela a la rebaja en la eficiencia de degradación de DQO.

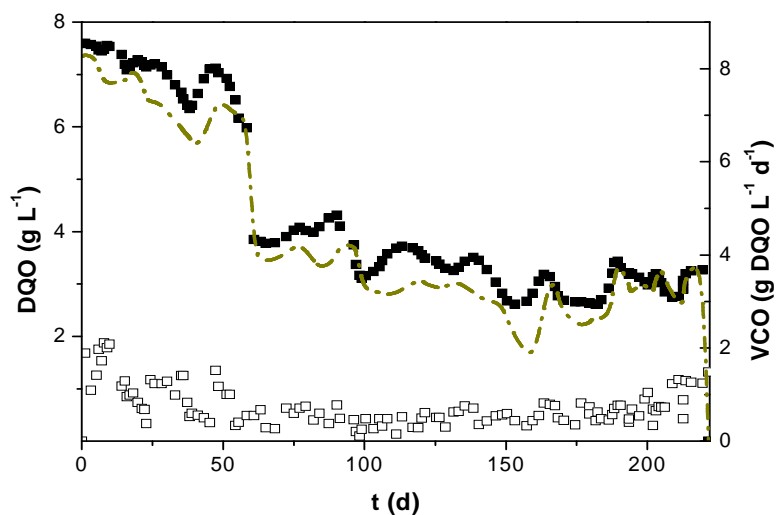


Figura 6.11: Evolución de la DQO en la entrada (■) y en la salida (□), así como de la VCO (línea discontinua) en el reactor EGSB-Bio.

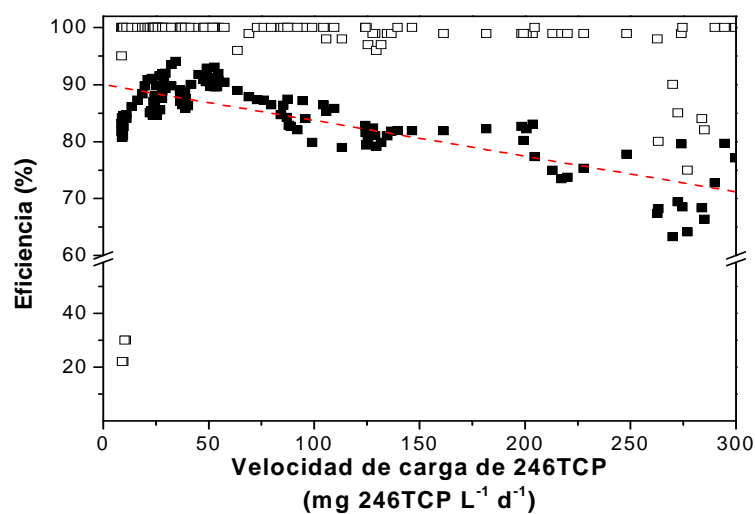


Figura 6.12: Eficiencia de eliminación de DQO (■) y de 246TCP (□) frente a la velocidad de carga de 246TCP. Ajuste lineal (línea roja discontinua) en el reactor EGSB-Bio.

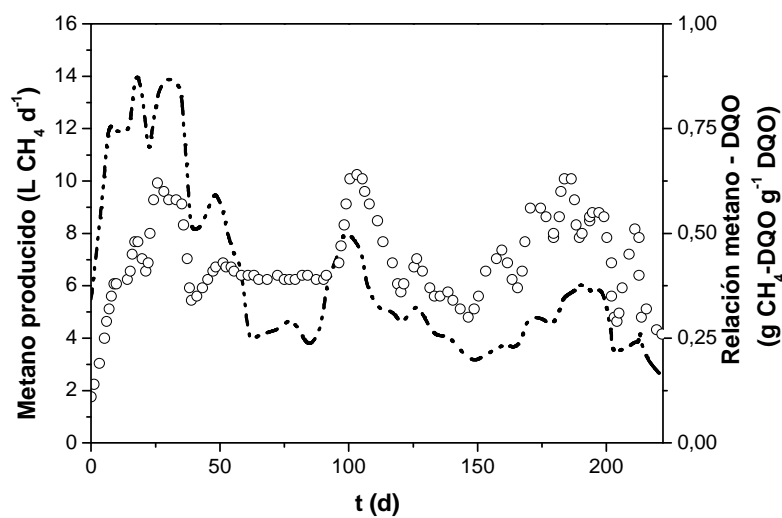


Figura 6.13: Producción de CH_4 (línea discontinua) y relación entre el CH_4 producido y la DQO consumida (○) en el reactor EGSB-Bio.

Por otra parte, la relación de CH₄ producido frente a la DQO consumida se situó en valores en torno a 0,35. A partir del día 150, bajo velocidades de carga de 246TCP superiores a 125 mg L⁻¹ d⁻¹, esta relación experimentó un aumento hasta valores en torno a 0,5 L CH₄ g⁻¹ DQO, aunque los últimos días disminuyó de manera paralela a la caída en la producción de CH₄. El mantenimiento en la producción de metano pese a trabajar con velocidades de carga de 246TCP relativamente altas se debe a la estrategia seguida de subir la carga de forma paulatina, permitiendo de esta manera una adaptación del consorcio metanogénico, el más sensible a los aumentos de carga de 246TCP. Precisamente, en el trabajo de [Tartakovsy et al. \(1999\)](#), se observó una respuesta similar de un reactor UASB bioaumentado con *D. hafniense* PCP-1 ensayando una subida de velocidad de carga de PCP de tipo lineal, en contraposición a un aumento potencial.

6.3.2.3 FBBR

En la Figura 6.14 se muestra la evolución del 246TCP en la entrada y en la salida, así como sus intermedios de reacción, durante el periodo de estudio en el reactor FBBR. A diferencia de lo sucedido en los reactores EGSB, los intermedios de reacción comienzan a aparecer en los efluentes a partir de 90 d de experimentación, debido principalmente a la capacidad adsorptiva del lecho de carbón activo empleado. Este asunto será tratado con más detalle posteriormente. Se observó a partir de 90 d de experimentación la aparición mayoritaria del 4CP, así como una cantidad importante de 24DCP, ambos productos de la *orto*-decloración del 246TCP. Cabe mencionar que se detectaron también 26DCP y 2CP, lo que indica que la vía *para* también se llevó a cabo, aunque en menor medida. A partir del día 200 del experimento se detectaron concentraciones relevantes de fenol. Este hecho permite asegurar que, al igual que sucedió en el reactor EGSB-Bio, se llevó a efecto la *para*-decloración de parte del 4CP formado.

Se conoce que ninguna de las cepas del género *Desulfitobacterium* introducidas al reactor pueden, por sí solas, ser capaces de declorar el 4CP ([Bouchard et al., 1996](#); [Sanford et al., 1996](#); [Breitenstein et al., 2001](#)). La aparición de relaciones sintróficas y/o mutualísticas entre las comunidades de *Desulfitobacterium* y otras bacterias o arqueas desarrolladas de forma espontánea debió de ser clave en la decloración del 4CP hasta fenol, permitiendo así

decolorar el 4CP resultante de la actividad de las bacterias *Desulfitobacterium* por otras comunidades decoloradoras desconocidas. En la Figura 6.15 se muestra la concentración molar de clorofenoles en la entrada y salida del reactor FBBR, así como la eficiencia de decoloración sin tener en cuenta el proceso de adsorción. Cuando el lecho de carbón activo se saturó, la eficiencia de decoloración comenzó a disminuir hasta alcanzar un equilibrio entre el 40-60%.

En cuanto al consumo de DQO, en la Figura 6.16 se muestra la evolución de la DQO en la entrada y salida, así como la VCO. La VCO se disminuyó desde un valor en torno a 7,5 hasta 3,75 g L⁻¹ d⁻¹ el día 43 del experimento debido a la elevada DQO remanente en el reactor (las eficiencias no superaban el 70%, Fig. 6.17). De esta forma se logró el crecimiento de un consorcio metanogénico estable. En otros trabajos se optó por inocular directamente la biomasa metanogénica en el reactor FBBR. [Khodadoust et al. \(1997\)](#) emplearon un reactor FBBR con carbón activo como soporte para el tratamiento de PCP en continuo. A pesar de inocular lodo metanogénico en el reactor, la eficiencia inicial del mismo fue menor del 80% de consumo de DQO, empleando VCO de 1,48 g COD L⁻¹ d⁻¹ y etanol como cosustrato. El reactor tardó 50 d en alcanzar las eficiencias máximas, por lo que queda en entredicho la necesidad de inoculación de biomasa activa, dado que es muy factible el crecimiento espontáneo de la misma, logrando resultados similares.

En la Figura 6.17 se muestra la evolución de la eficiencia de consumo de DQO y de eliminación de 246TCP. Se observa que la eficiencia de consumo de DQO aumentó paulatinamente desde el inicio del ensayo hasta aproximadamente el día 70 de experimentación, llegando a valores en torno al 85%. Así, se sugiere que durante este periodo de tiempo se estuvo desarrollando una comunidad metanogénica hasta alcanzar la madurez fisiológica, lo cual derivó en la estabilidad en el consumo de DQO detectada. La ligera tendencia decreciente en la eficiencia de consumo de DQO detectada a partir de este momento está vinculada al aumento de velocidad de carga de 246TCP, de tal manera que, en vista de los resultados obtenidos y en el intervalo de velocidades de carga de 246TCP de estudio, se determinó que un aumento de velocidad de carga de 246TCP de 100 mg L⁻¹ d⁻¹ resultó en una disminución de eficiencia de consumo de DQO del 3%, partiendo de una eficiencia del 84%. Este valor contrasta positivamente con los determinados en los reactores EGSB, lo cual implica que la inhibición en el consumo de DQO detectada en el FBBR fue inferior a la misma en los reactores EGSB.

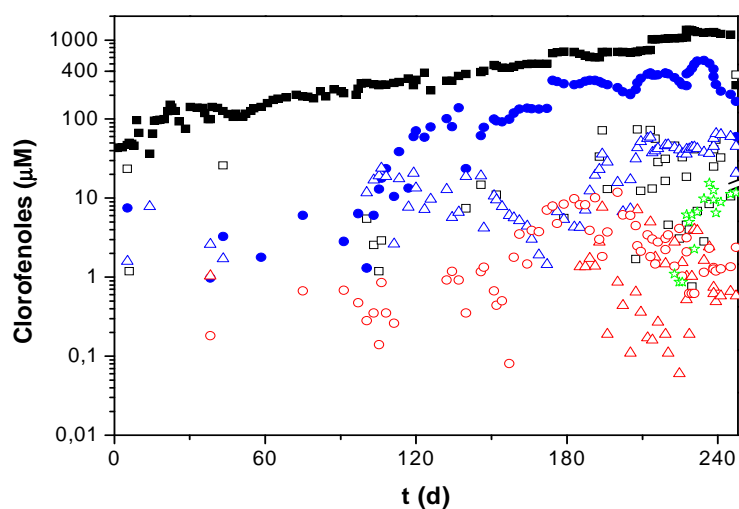


Figura 6.14: Evolución de la concentración molar del 246TCP en la entrada (■) y en la salida (□), así como de los intermediarios de dechloración en posición *orto*: 24DCP (Δ), 4CP (●) y *para*: 26DCP (Δ), 2CP (○), y fenol (★) en el reactor FBBR. Nótese la escala logarítmica.

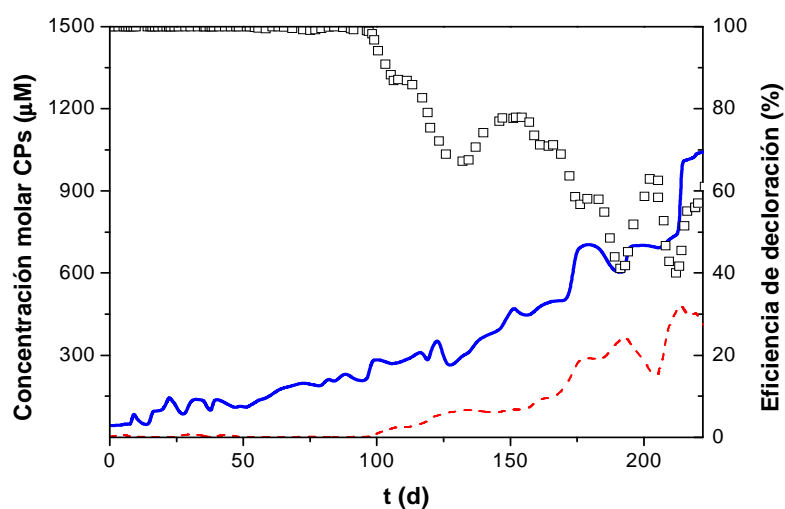


Figura 6.15. Evolución de la concentración molar de clorofenoles en la entrada (línea azul) y salida (línea roja), así como de la eficiencia de dechloración (□) en el reactor FBBR.

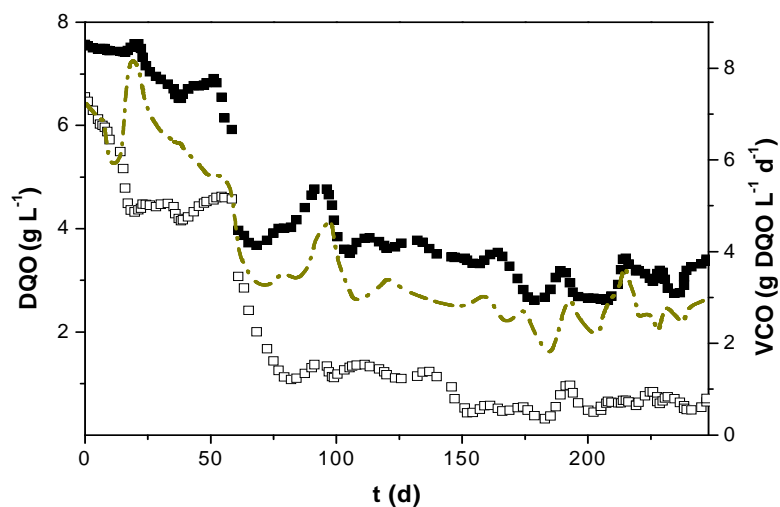


Figura 6.16: Evolución de la DQO en la entrada (■) y en la salida (□), así como de la VCO (línea discontinua) en el reactor FBBR.

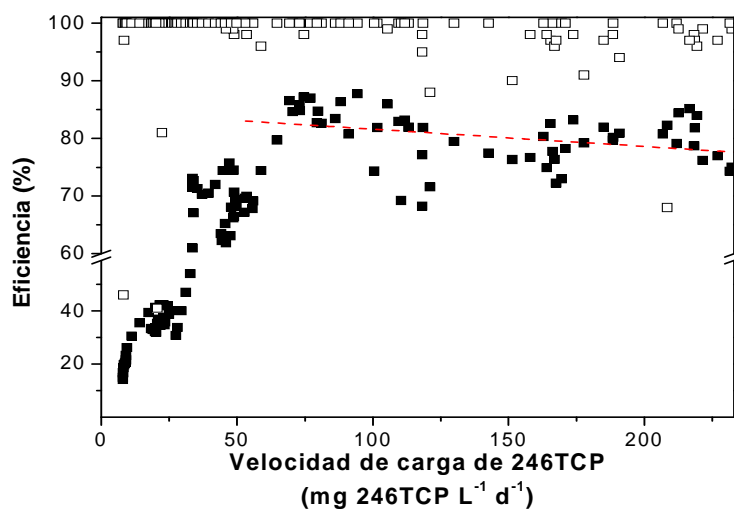


Figura 6.17: Eficiencia de eliminación de DQO (■) y de 246TCP (□) frente a la velocidad de carga de 246TCP en el reactor FBBR. Ajuste lineal a partir de 70 mg 246TCP L⁻¹ d⁻¹ (línea roja discontinua) en el reactor FBBR.

6.3.2.4 Estudio de la adsorción de 246TCP sobre carbón activo

Con objeto de determinar la capacidad biodegradativa real del reactor FBBR, se realizó un estudio enfocado a dilucidar el proceso de adsorción de 246TCP sobre el lecho de carbón activo empleado como soporte para la adhesión de los microorganismos del género *Desulfitobacterium*. Para ello, inicialmente se realizó un estudio cinético sobre la adsorción del 246TCP en el carbón activo y en el carbón activo con biopelícula, empleando concentraciones de carbón activo de 2 g L⁻¹ y concentraciones entre 10 y 500 mg 246TCP L⁻¹. En la Figura 6.18 se muestra la evolución de la capacidad adsorptiva del carbón activo (q_t) durante estos experimentos, encontrándose que el equilibrio se alcanzó antes de 24 h. Para determinar el equilibrio de adsorción se realizaron ensayos empleando una concentración de carbón activo de 0,5 g L⁻¹ y concentraciones entre 10 y 500 mg 246TCP L⁻¹, determinando para cada concentración de 246TCP la cantidad adsorbida (q_e) y la concentración en el medio en el equilibrio (C_e) (Ecuación 6.1) Estos valores se ajustaron posteriormente a la isoterma de Freundlich (Ecuación 6.2).

$$q_e = (C_o - C_e) \cdot \frac{V}{m} \quad [6.1]$$

$$q_e = K_f \cdot C_e^{\frac{1}{n_f}} \quad [6.2]$$

siendo K_f y n_f las constantes de Freundlich para una temperatura dada. En la Figura 6.19 se muestra el resultado del ajuste de los datos experimentales a la isoterma de Freundlich. Los valores estimados de los parámetros K_f y n_f fueron 14,2 L g⁻¹ y 2,4 para el carbón activo, y 12,9 L g⁻¹ y 3,1 para el carbón activo con biopelículas ($R^2 = 0,98$ y 0,97, respectivamente). El ajuste se realizó por regresión no lineal utilizando el programa informático Microcal® Origin 7.5. La isoterma de Freundlich ha sido utilizada previamente para describir el equilibrio de adsorción de 246TCP sobre carbón activo y otros materiales adsorbentes similares trabajando a 30 °C (Hameed, 2007; Hameed et al., 2008; Tan et al., 2009).

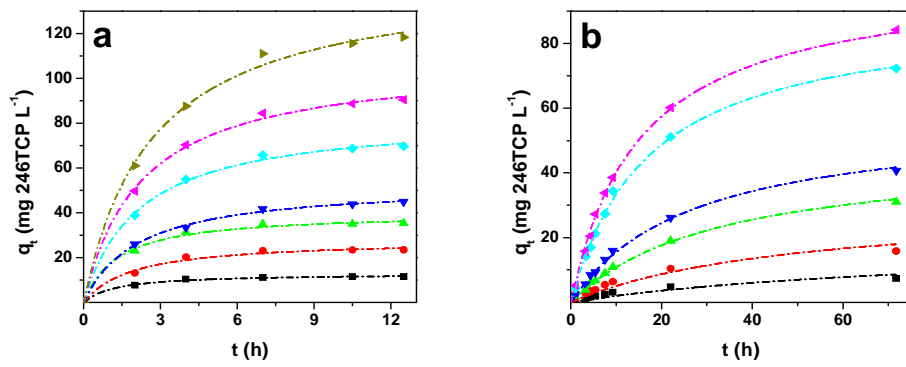


Figura 6.18: Evolución de la cantidad de 246TCP adsorbida sobre carbón activo (a) y carbón activo con biopelícula (b) para concentraciones de 246TCP entre 10 y 500 mg L^{-1} .

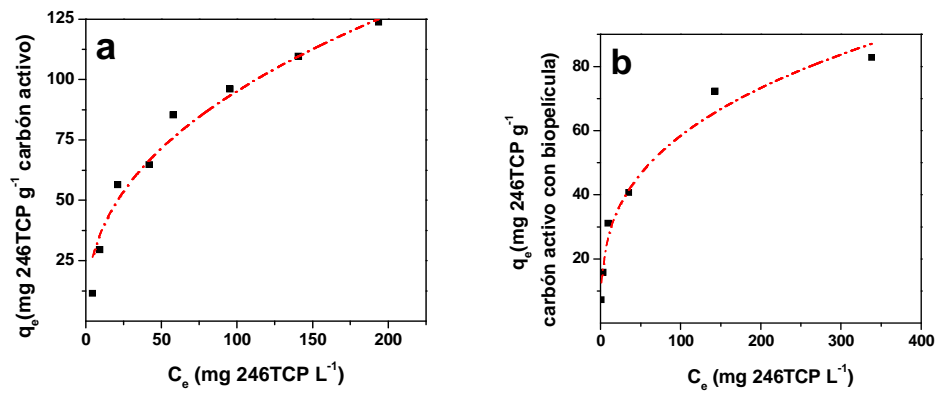


Figura 6.19: Isotermas de adsorción del 246TCP sobre carbón activo (a) y sobre carbón activo con biopelícula (b) y ajuste a la Ecuación de Freundlich (línea roja discontinua).

A partir de los parámetros calculados de la isoterma de Freundlich se generaron las curvas de rotura para el 246TCP. Para ello, se asumió equilibrio de adsorción de 246TCP sobre el carbón activo entre las concentraciones de la fase acuosa y la fase sólida. Además, se asumió que sólo se produjo adsorción y que no ocurrieron interacciones entre el adsorbente y el adsorbato. Debido a la relación 220:1 entre los caudales de entrada del influente y recirculación, se asumió funcionamiento en mezcla perfecta. Estas asunciones han sido previamente tenidas en cuenta en el tratamiento de PCP empleando un reactor FBBR (Khodadoust et al., 1997). De esta manera, un balance del 246TCP en el FBBR condujo a una ecuación diferencial de primer orden (Ecuación 6.4).

$$Q \cdot C_o - Q \cdot C = (V_T - V_c) \frac{\partial C}{\partial t} + M_c \frac{\partial q}{\partial t} \quad [6.4]$$

Donde Q es el caudal diario de entrada al reactor ($L \cdot d^{-1}$), V_T y V_c son los volúmenes del reactor y del carbón activo, respectivamente (L), C_o y C son las concentraciones de entrada y salida al FBBR, respectivamente ($mg \cdot L^{-1}$), M_c es la masa del carbón activo (g) y q es la cantidad de 246TCP presente en el carbón activo en cada momento ($mg \cdot 246TCP \cdot g^{-1}$ carbón activo). Sustituyendo la Ecuación 6.3 en la Ecuación 6.4 y derivando, se obtuvo la siguiente ecuación diferencial de primer orden (Ecuación 6.5):

$$(V_T - V_c) \frac{\partial C}{\partial t} + M_c \cdot K_f \cdot \frac{1}{n} C^{\frac{1}{n}-1} \frac{\partial C}{\partial t} + Q \cdot C_f - Q \cdot C_o = 0 \quad [6.5]$$

Empleando la Ecuación 6.5 se generó la curva de rotura para la adsorción de 246TCP sobre el carbón activo en el FBBR. La simulación se realizó por tramos, correspondiendo cada tramo a cada una de las velocidades de carga de 246TCP ensayadas. Las condiciones de contorno de la integración de cada tramo se obtuvieron del último valor simulado en la integración del tramo anterior. Para el primer tramo, estas condiciones fueron $t = 0,0001 \cdot d$ y $C = 0,0001 \cdot mg \cdot 246TCP \cdot L^{-1}$, por motivos de convergencia. En la Figura 6.20 se muestra la evolución de la concentración molar de clorofenoles en el efluente del FBBR, así como la curva de rotura predicha por el modelo de adsorción empleando las constantes de la ecuación de Freundlich calculadas para el carbón activo y para el carbón activo con biopelículas. Se puede observar como la simulación varía sustancialmente teniendo en cuenta

la biopelícula formada sobre el carbón activo, ya que la predicción de la curva de saturación sucede en tiempos anteriores.

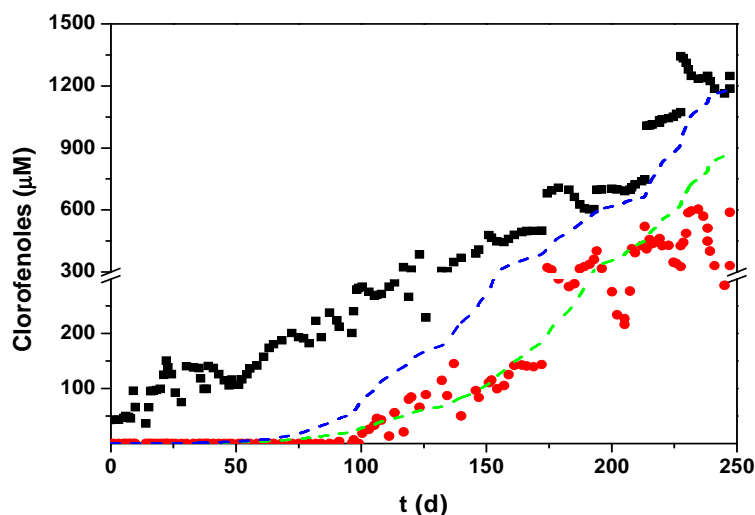


Figura 6.20: Evolución de la cantidad molar de clorofenoles en la entrada (■), salida (●) así como predicción de la curva de rotura utilizando el modelo con los parámetros de Freundlich calculados a partir del carbón activo (línea verde discontinua) y del carbón activo con biopelícula (línea azul discontinua).

Haciendo un balance de masas se calculó la cantidad total de 246TCP introducida al sistema, la cantidad total de clorofenoles que salieron del sistema, la cantidad total adsorbida predicha por el modelo y declarada y el porcentaje total de biodegradación teniendo en cuenta ambos modelos, lo que se presenta en la Tabla 6.2. La diferencia entre el modelo de adsorción y los datos experimentales sugieren una elevada actividad decloradora, aunque esta actividad es mayor si se tiene en cuenta la adsorción sobre el carbón activo con biopelícula. En un estudio similar en el que se trató naftaleno, se encontró que del 95% del compuesto eliminado en el proceso en continuo empleando reactores FBBR inoculados con carbón activo, la biodegradación real calculada como la diferencia entre la curva de adsorción abiótica y los resultados obtenidos se estimó en un 58% (Koran et al., 2001). En la Figura 6.21 se muestra la

evolución del porcentaje de decloración real calculado a partir de la simulación empleando las constantes de la isoterma de Freundlich a partir de carbón activo y de carbón activo con biopelícula.

Tabla 6.2: Balance de masa acumulado utilizando la Ecuación 6.5 (en g clorofenol) sobre carbón activo y sobre carbón activo con biopelícula.

Modelo	Cantidad total entrada	Cantidad total salida	Cantidad adsorbida	Cantidad declorada	% Adsorción	% Decloración
Carbón activo	76,67	24,90	44,36	7,41	57,86	9,67
Carbón activo + biopelícula			22,17	29,60	28,91	38,61

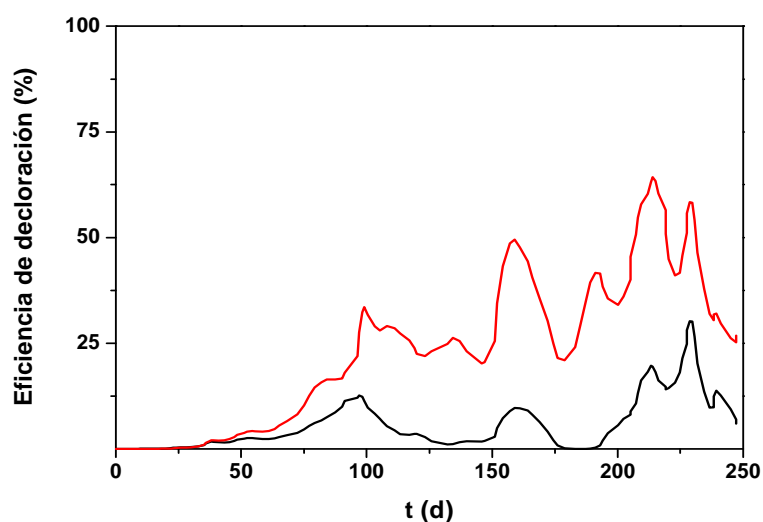


Figura 6.21: Evolución de la eficiencia de decloración obtenida a partir de los datos experimentales y los datos de simulación de la adsorción de 246TCP sobre carbón activo (línea negra) y sobre carbón activo con biopelícula (línea roja).

Se puede observar como, aunque la decloración real simulada a partir del carbón activo con biopelícula es superior, en ambos casos la tendencia en estos valores es ascendente,

a pesar del aumento en la velocidad de carga de 246TCP, lo cual implica que la actividad de las bacterias dechloradoras fue incrementándose a lo largo del periodo de estudio, probablemente coincidiendo con el desarrollo y el establecimiento de las cepas *Desulfitobacterium* en las biopelículas formadas sobre el carbón activo.

6.3.2.5 Comparación del comportamiento de los reactores

Es conveniente comparar el funcionamiento de los reactores para obtener conclusiones que permitan valorar la utilización de una de las tecnologías descritas. En la Figura 6.22 se muestra la comparación del comportamiento de los reactores en términos de consumo de DQO (6.22a), producción de metano (6.22b) y *orto*-dechloración del 246TCP (6.22c). La velocidad de carga de 246TCP está especificada en $\mu\text{M d}^{-1}$ para poder compararla más fácilmente con la concentración de clorofenoles en la salida. La eficiencia del consumo de DQO fue ligeramente superior en el reactor FBBR al final de la operación, momento en el que los reactores estuvieron sometidos a mayor velocidad de carga de 246TCP. Además, este reactor fue el único que mantuvo, a partir de la estabilización, la eficiencia de DQO constante (en torno al 80%). La capacidad adsorptiva que confiere el carbón activo pudo funcionar como protección para la biopelícula desarrollada en su superficie. Por otra parte, debido a la inoculación de las cepas *Desulfitobacterium*, es posible que la proporción de este género fuese mayor que en el lodo granular de los reactores EGSB, aunque este tema será discutido con posterioridad en el Capítulo 8.

La actividad metanogénica de los reactores EGSB se mantuvo aproximadamente constante, aunque en el reactor EGSB-Bio aumentó ligeramente a lo largo del proceso hasta velocidades de carga de 246TCP superiores a $1000 \mu\text{M d}^{-1}$ ($200 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). El comportamiento similar de ambos reactores EGSB en la actividad metanogénica y en la eficiencia de DQO sugiere que el lodo utilizado como inóculo tuviera bacterias halorespiradoras que sirviesen como protección para las bacterias fermentadoras (lo cual explicaría el mantenimiento de la eficiencia de DQO) y los metanógenos. Este tipo de bacterias suelen formar colonias en la superficie de los gránulos anaerobios, protegiendo de esta manera la actividad de los organismos internos, como los acetógenos, situados en capas medias del gránulo, y los metanógenos, que se localizan mayoritariamente en capas internas cuando están sometidos a condiciones inhibitorias. Lanthier et al. (2002) observaron esta

disposición en el estudio de la microestructura de los gránulos de un reactor UASB, bioaumentado con *Desulfitobacterium hafniense* PCP-1, para degradar PCP.

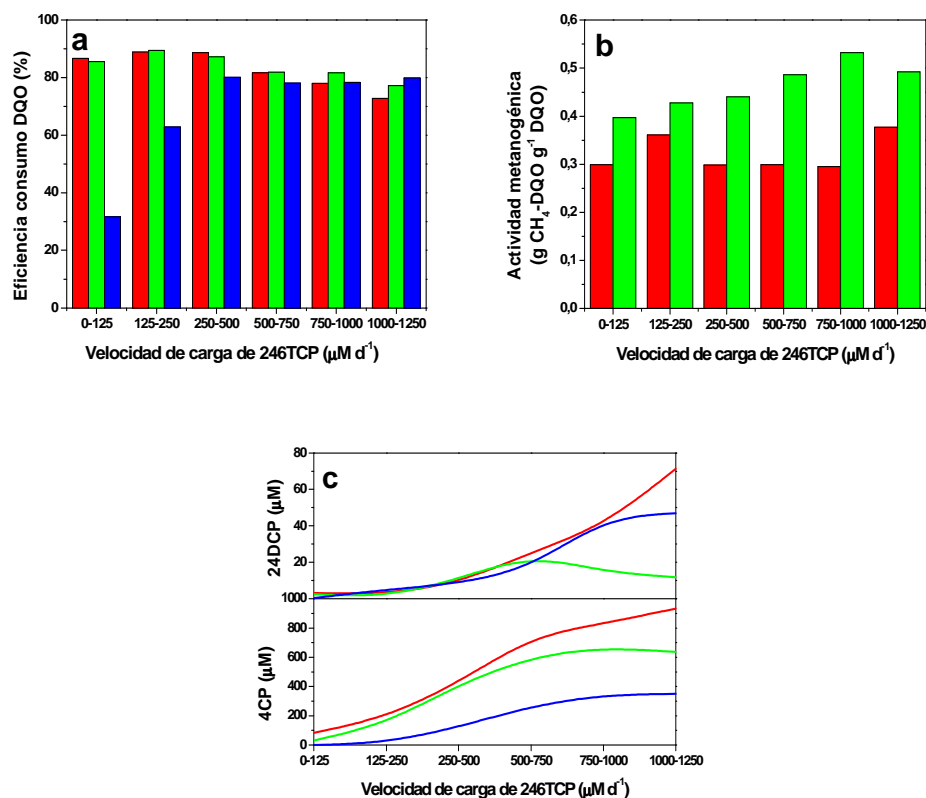


Figura 6.22: Comparación del funcionamiento de los reactores EGSB-C (rojo), EGSB-Bio (verde) y FBBR (azul) en intervalos de velocidades de carga molar de 246TCP aplicados. (A) Eficiencia media de consumo de DQO. (B) Actividad metanogénica media. (C) Concentración molar de 24DCP y 4CP, productos derivados de la *orto*-decloración del 246TCP. (D) Concentración molar de 26DCP y 2CP, derivados de la *para*-decloración del 246TCP.

Respecto a la generación de intermedios de reacción, en todos los reactores apareció como intermedio mayoritario el 4CP. En los reactores EGSB, especialmente en el reactor EGSB-C, el aumento en la aparición del 24DCP implica una inhibición parcial de la microbiota, bien sea por la aplicación de velocidades de carga elevadas de 246TCP, o bien por posibles efectos de inhibición competitiva entre 246TCP y 24DCP, aunque es probable que ambos efectos se den simultáneamente. La aparición de compuestos derivados de la *para*-decloración de 246TCP a velocidades de carga de 246TCP inferiores a $500 \mu\text{M d}^{-1}$ ($100 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) implica una adaptación progresiva a la *orto*-decloración. Aunque estos intermedios siguen apareciendo a lo largo de la operación, su relevancia en el cómputo global es cada vez menos significativa, quedando como reacciones residuales para velocidades de carga de 246TCP superiores a $1000 \mu\text{M d}^{-1}$ ($200 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

En resumen, el reactor que mejor soporta las velocidades de carga de 246TCP es el FBBR aunque, en el intervalo de velocidades de carga de 246TCP ensayado, la diferencia del comportamiento con los reactores EGSB es poco apreciable. Se ha detectado una mejoría sustancial en la actividad metanogénica y ligera en la actividad decloradora en el reactor EGSB-Bio respecto al EGSB-C, si bien las diferencias entre ambos reactores no permiten justificar la necesidad de la bioaumentación.

6.3.3 Estudios de toxicidad extrema

6.3.3.1 Estudio de toxicidad por aumento de velocidad de carga

En la Figura 6.23 se muestra la evolución de la concentración de 246TCP, de sus principales intermedios de degradación (24DCP y 4CP) y del pH, en los reactores EGSB-C (Figura 6.23a), EGSB-Bio (Figura 6.23b) y FBBR (Figura 6.23c), así como la evolución de la DQO en la salida en los tres reactores (Figura 6.23d) y la producción de metano en los reactores EGSB (Figura 6.23e). La línea vertical indica el momento en el que se volvió a la velocidad de carga de 246TCP anterior al experimento (en torno a $250 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Se observa que en los tres reactores se recuperó el comportamiento inicial en cuanto a degradación de 246TCP, DQO y generación de metano, en el caso de los reactores EGSB, en un tiempo de 44 h.

En el reactor EGSB-C el aumento de carga apenas tuvo incidencia en la actividad decloradora de los microorganismos, ya que las concentraciones tanto de 24DCP como de 4CP no sufrieron variaciones importantes. Esto invita a pensar que se alcanzó la máxima capacidad declorativa de la microbiota que, unido a efectos tóxicos propios del aumento de velocidad de carga de 246TCP, supuso un aumento en la concentración de 246TCP de salida de 246TCP próxima a 2500 mM. En el reactor EGSB-Bio, en cambio, la actividad decloradora se vio afectada con la disminución de la concentración de 4CP y el aumento de 24DCP, lo cual pudo ser debido a un incremento en la magnitud del efecto inhibitorio competitivo entre la decloración de 246TCP y la de 24DCP. En cualquier caso, el efecto inhibitorio del 246TCP, ya sea del tipo competitivo o debido a la toxicidad inherente de 246TCP, resultó inferior que en el reactor EGSB-C, ya que la concentración máxima alcanzada de 246TCP fue de 2000 mM.

Finalmente, la concentración máxima alcanzada en el FBBR se situó en torno a 1000 mM. La capacidad amortiguadora del carbón activo parece ser la causa principal de ello, dado que el aumento en la concentración de 246TCP supone el desplazamiento del equilibrio de adsorción, lo que permite que parte de la cantidad de 246TCP quede retenida en el carbón activo. De todas formas, la actividad decloradora de las biopelículas debió verse afectada, ya que la concentración de 4CP disminuyó de forma considerable.

Por otro lado, se detectaron diferencias relevantes en el efecto inhibitorio sobre el consumo de DQO entre los reactores. Así, el aumento de velocidad de carga de 246TCP supuso una inhibición en el consumo de DQO en torno al 60% en los reactores EGSB, mientras que la inhibición detectada en el FBBR fue de tan sólo el 10%, lo que implica que la mayor robustez del FBBR en este aspecto. Respecto a la producción de metano, la inhibición detectada en los reactores EGSB fue muy similar, en torno al 60%, aunque en el reactor EGSB-Bio la recuperación de esta actividad fue sustancialmente más rápida que en el reactor EGSB-C.

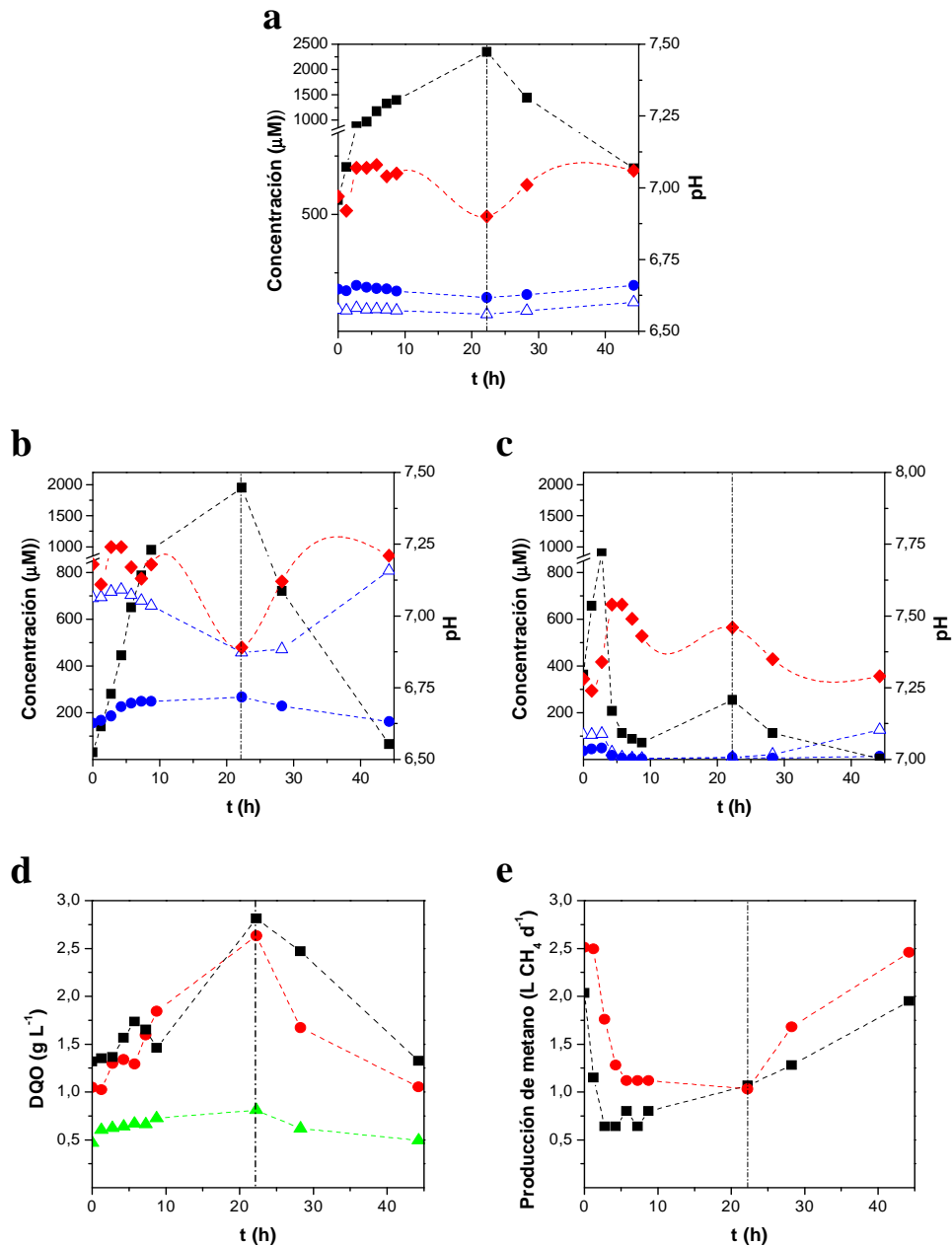


Figura 6.23: Evolución temporal del 246TCP (■), 24DCP (●) y 4CP (Δ), así como del pH (♦), en los reactores EGSB-C (a), EGSB-Bio (b) y FBBR (c); y evolución de la DQO (d) y de la producción de CH₄ (e) en los reactores EGSB-C (■), EGSB-Bio (●) y FBBR (▲) durante el estudio en régimen no estacionario a 1000 mg 246TCP L⁻¹ d⁻¹ en continuo.

6.3.3.2 Estudio de toxicidad por pulso tóxico

En la Figura 6.24 se muestra la evolución de 246TCP (Figura 6.24a), pH (Figura 6.24b), DQO (Figura 6.24c) y producción de metano (Figura 6.24d) durante el transcurso de este ensayo. El pH sufrió un aumento considerable en sendos reactores desde un valor próximo a 7,0 hasta 8,5. La microbiota se sometió, por tanto, a un estrés tóxico y alcalino. Respecto a la evolución de 246TCP en la salida de los reactores, el FBBR logró recuperar su eficiencia inicial en 135 h, mientras que al final del mismo intervalo temporal, la concentración de 246TCP en la salida de los reactores EGSB-C y EGSB-Bio fue de 750 y 244 mM, respectivamente.

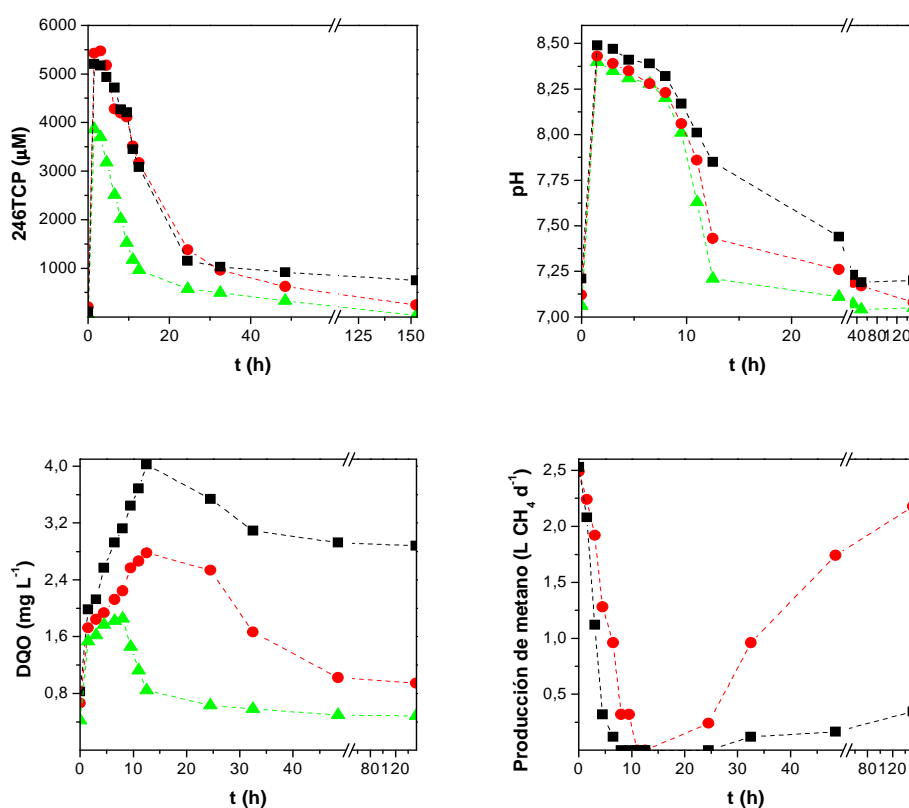


Figura 6.24: Evolución temporal del 246TCP (a), pH (b), DQO (c) y producción de metano (d) en los reactores EGSB-C (■), EGSB-Bio (●) y FBBR (▲) durante el estudio en régimen no estacionario a $1000 \text{ mg } 246\text{TCP L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en pulso.

Además, cabe reseñar que, en el reactor FBBR, la concentración inicial de 246TCP fue sustancialmente menor que en los reactores EGSB, lo cual pudo deberse al efecto amortiguador del carbón activo mencionado durante la discusión del apartado anterior.

Respecto a la inhibición en el consumo de DQO, en el reactor EGSB-C la adición del pulso de 246TCP provocó una subida paulatina de la DQO hasta 4 g L^{-1} en 12,5 h, registrándose una inhibición del 68% respecto a la eficiencia de DQO inicial 135 h después de la adición del pulso. En el reactor EGSB-Bio el máximo valor de DQO detectado en la salida fue de $2,78 \text{ g L}^{-1}$, 12,5 h después de la adición del pulso, y la inhibición de la DQO a 135 h fue 9%. En el reactor FBBR, la DQO alcanzó su mayor valor a las 8 h de la introducción del pulso ($1,85 \text{ g L}^{-1}$), siendo el porcentaje de inhibición de tan sólo el 1,8% al finalizar el ensayo. Respecto a la respuesta de la metanogénesis al pulso añadido, en ambos reactores EGSB se inhibió totalmente, pero la respuesta fue distinta. En el reactor EGSB-C esta inhibición se detectó en tiempos anteriores que en el reactor EGSB-Bio. Además, el porcentaje de inhibición de la producción de metano tras 135 h fue 87% y 13%, respectivamente. Los resultados obtenidos permiten asegurar que mediante la bioaugmentación de reactores EGSB se consigue una mayor estabilidad tanto en el consumo de DQO como en la producción de metano.

6.3.3.3 Implicaciones de los resultados obtenidos con los estudios de toxicidad extrema

Como se ha mostrado en el punto 6.3.2, las diferencias en el comportamiento de los reactores EGSB y FBBR no son demasiado apreciables en el cómputo global del proceso en continuo. Teniendo sólo en cuenta estos resultados, la bioaugmentación podría parecer innecesaria. Tras valorar los resultados obtenidos en los estudios bajo régimen no estacionario, esta discusión se ve modificada sustancialmente. Evidentemente, en casos reales no se puede plantear un tratamiento asumiendo que las velocidades de carga del 246TCP son constantes y controlables.

La capacidad que presentan tanto el reactor EGSB-Bio como, en mayor medida, el reactor FBBR, de soportar aumentos y picos de carga puntuales aparece así como una ventaja importante a la hora de seleccionar un tratamiento adecuado para la eliminación del 246TCP,

valorando tanto la eficiencia global del sistema como la estabilidad del mismo. De esta manera, es inadmisibles que, tras un episodio inhibitorio puntual un reactor anaerobio, no recupere su actividad inicial tras 120 h, como en el caso de la eficiencia de DQO en el reactor EGSB-C (Figura 6.24c). Por otro lado, la robustez presentada por el reactor FBBR en los estudios de toxicidad extrema parece estar más relacionada con la capacidad amortiguadora del carbón activo que con la propia actividad de los microorganismos. En condiciones reales, operando en continuo durante periodos más prolongados, el carbón activo perdería esta capacidad de amortiguación, por lo que los efectos de los episodios de toxicidad extrema serían similares que en los reactores EGSB. De hecho, una solución que permita mantener esta capacidad amortiguadora radica en la sustitución de parte del carbón activo saturado por carbón activo virgen ([Khodadoust et al., 1997](#)), lo que, evidentemente, comporta un elevado gasto adicional que, en muchos casos, no es asumible.

Por otra parte, la mayor estabilidad del sistema EGSB-Bio que el sistema EGSB-C justifica la necesidad de la bioaumentación. En algunos estudios se ha concluido que la bioaumentación de un reactor del tipo UASB sólo permite disminuir el tiempo de adaptación de la biomasa ([El Fantroussi y Agathos, 2005](#)), ya que los lodos anaerobios presentan una elevada diversidad microbiológica que les permite desarrollar comunidades que pueden adaptarse a realizar la función deseada. Los resultados obtenidos en el capítulo muestran como la bioaumentación no sólo disminuye el tiempo de adaptación, sino que también mejora la estabilidad del sistema. La bioaumentación permite acelerar las relaciones de dependencia entre comunidades microbiológicas, creando relaciones mutualistas o comensuales imposibles de alcanzar sin bioaumentar debido al desarrollo uniforme de las diferentes comunidades. Así, la bioaumentación permite que los microorganismos más sensibles a los compuestos tóxicos posean protección desde el principio del periodo operacional, lo que condiciona tanto su velocidad de crecimiento como la localización dentro de la comunidad microbiológica (ya sea flóculo, gránulo o biopelícula). En caso de que las cepas bioaumentadas perduren en el sistema, el desarrollo y estructura de la biomasa se verá influido por la presencia de estas cepas.

CAPÍTULO 7

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA DE 246TCP CON REACTORES DE ALTA EFICIENCIA

*El poder político es simplemente el poder organizado de
una clase para oprimir a otra.*

K. Marx

Resumen

Se ha estudiado la evolución de la densidad, estructura y composición microbiana de los biogránulos y de las biopelículas adheridas al carbón activo extraídos de los reactores EGSB y FBBR empleados en el Capítulo 6. Las muestras se tomaron los días 0, 30, 62 y 248 después del periodo de bioaumentación. La densidad se estudió mediante el análisis de los SSV. El contenido en SSV disminuyó en los gránulos de los reactores EGSB, mientras que la densidad granular aumentó en los tres reactores. La evolución de la estructura de las muestras se estudió mediante SEM. La diversidad morfológica exterior de microorganismos disminuyó en ambos reactores EGSB, aunque se conservó la diversidad interior. Los microorganismos se compactaron en ambos reactores, manteniéndose la estratificación. En los gránulos del reactor EGSB-C se observaron fisuras y oquedades, indicio de desintegración granular. El desarrollo de la biopelícula sobre el carbón activo del reactor FBBR fue irregular.

La composición microbiana se estudió mediante FISH. Se analizaron cuantitativamente las comunidades de arqueas y del género *Desulfitobacterium* spp. con sondas específicas para cada comunidad. En el reactor EGSB-C la proporción de arqueas disminuyó desde el 73,5% hasta el 56,7%, mientras que esta proporción se mantuvo aproximadamente estable en el reactor EGSB-Bio (en torno al 55%). En el reactor FBBR se desarrolló la comunidad metanogénica pese a no ser inoculada inicialmente, hasta alcanzar un proporción del 35%. Respecto al análisis cuantitativo del género *Desulfitobacterium*, se comprobó que el lodo utilizado como inóculo en los reactores EGSB contenía una elevada proporción de microorganismos de este género, los cuales fueron identificados y cuantificados como pertenecientes a la especie *D. hafniense*. En los tres reactores la proporción de *Desulfitobacterium* disminuyó inicialmente debido al lavado, aunque posteriormente se recuperó hasta alcanzar una proporción en torno al 55%. La diferencia en las eficiencias obtenidas con los reactores empleados en el Capítulo 6 se pueden explicar por la presencia y desarrollo de *D. chlororespirans* en los reactores EGSB-Bio y FBBR, especie que juega un papel clave en la dechloración anaerobia del 246TCP y en el mantenimiento de la estabilidad de los reactores.

7.1 Introducción

La ecología microbiana ha sido utilizada desde principios del S. XX para estudiar el comportamiento y la evolución de los microorganismos presentes en un ambiente. Con la aplicación, a partir de los años 80, de las técnicas de biología molecular el desarrollo de la denominada ecología molecular ha sido espectacular, abriendo un abanico de posibilidades hasta entonces impensables. Esta disciplina combina la ecología con la genética. Se trata, pues, de una disciplina más objetiva que el estudio morfológico o fisiológico de los microorganismos, técnicas tradicionalmente utilizadas para la identificación microbiana. Son técnicas independientes de cultivo, en las que generalmente se estudia el ARNr debido a que está presente en todos los microorganismos y a que apenas se ve afectado por la transferencia horizontal de genes, ya que forma parte de la maquinaria de síntesis de proteínas, lo que hace que sea una molécula muy estable.

Para el estudio de los microorganismos procariotas se utiliza la subunidad ribosomal menor (ARNr 16S) que, sin ser tan grande como la subunidad 23S, posee un tamaño adecuado para realizar análisis estadísticos (Figura 7.1). Además, su secuencia contiene regiones que permiten la detección de relaciones filogenéticas tanto próximas (nivel de especie) como distantes (*phylum* o dominio). La comparación de secuencias de ARNr 16S proporciona valores de homología filogenéticamente mucho más precisos que cualquier otra técnica. De este modo, las técnicas de biología molecular permiten estudiar la biodiversidad microbiana *in situ* en ecosistemas naturales, sin recurrir al aislamiento y cultivo ([Pace, 1997](#); [Talbot et al., 2008](#)).

La técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) para la identificación de procariotas consiste en hibridar una región del ARNr 16S con un oligonucleótido (sonda) que está marcado en su extremo 5' con una molécula fluorescente. La sonda está diseñada para que hibride selectivamente con el ARNr del grupo filogenético que se pretende estudiar. De esta forma, esta técnica permite no sólo la identificación sino la cuantificación de un grupo determinado. El problema es que, debido a la estructura cuaternaria del ribosoma, la accesibilidad del ARNr 16S limita la hibridación de la sonda diseñada en la región deseada, por lo que se ha establecido una clasificación del ARNr 16S en

función de la accesibilidad de la molécula a la entrada de sondas. Esta clasificación divide el ARNr 16S en 6 clases (I-VI, Figura 7.2), considerando las regiones I-IV como las más adecuadas para el diseño de las sondas (Fuchs et al., 1998). Por otra parte, el proceso de hibridación generalmente necesita inhibidores para evitar que la sonda hibride en regiones del ARNr con uno o más nucleótidos diferentes a la zona objetivo (*mismatches*) y asegurar de esta manera su especificidad. El compuesto que habitualmente se utiliza para inhibir la hibridación inespecífica es la formamida.

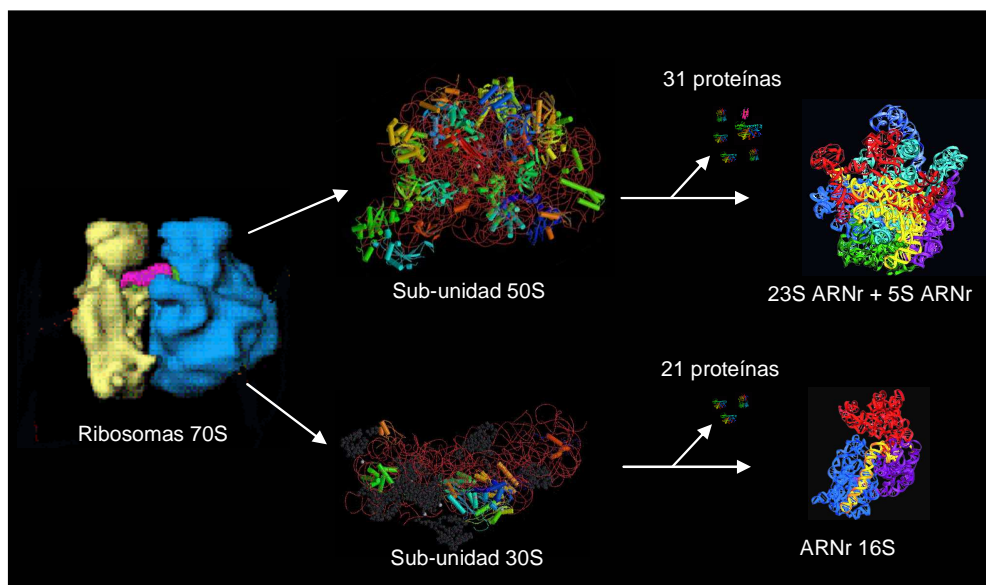


Figura 7.1: Estructura del ribosoma bacteriano de procariotas (70S), compuesto por dos subunidades desiguales en tamaño, con valores de sedimentación (Svedbergs) de 30S y 50S (Spedding, 1990).

El estudio de la composición microbiana de lodos anaerobios mediante FISH se comenzó a emplear a principios de los años 90 (Amann, 1995). Desde entonces, se ha analizado mediante esta técnica la estructura granular (Rocheleau et al., 1999; Sekiguchi et al., 1999; González-Gil et al., 2001), la distribución microbiana de metanógenos y sulfatorreductores (Santegoeds et al., 1999; Sekiguchi et al., 1999; Tagawa et al., 2000;

González-Gil et al., 2001) y la topografía y biodiversidad (Rocheleau et al., 1999; Saiki et al., 2002; Calli et al., 2006; Díaz et al., 2003, 2006).

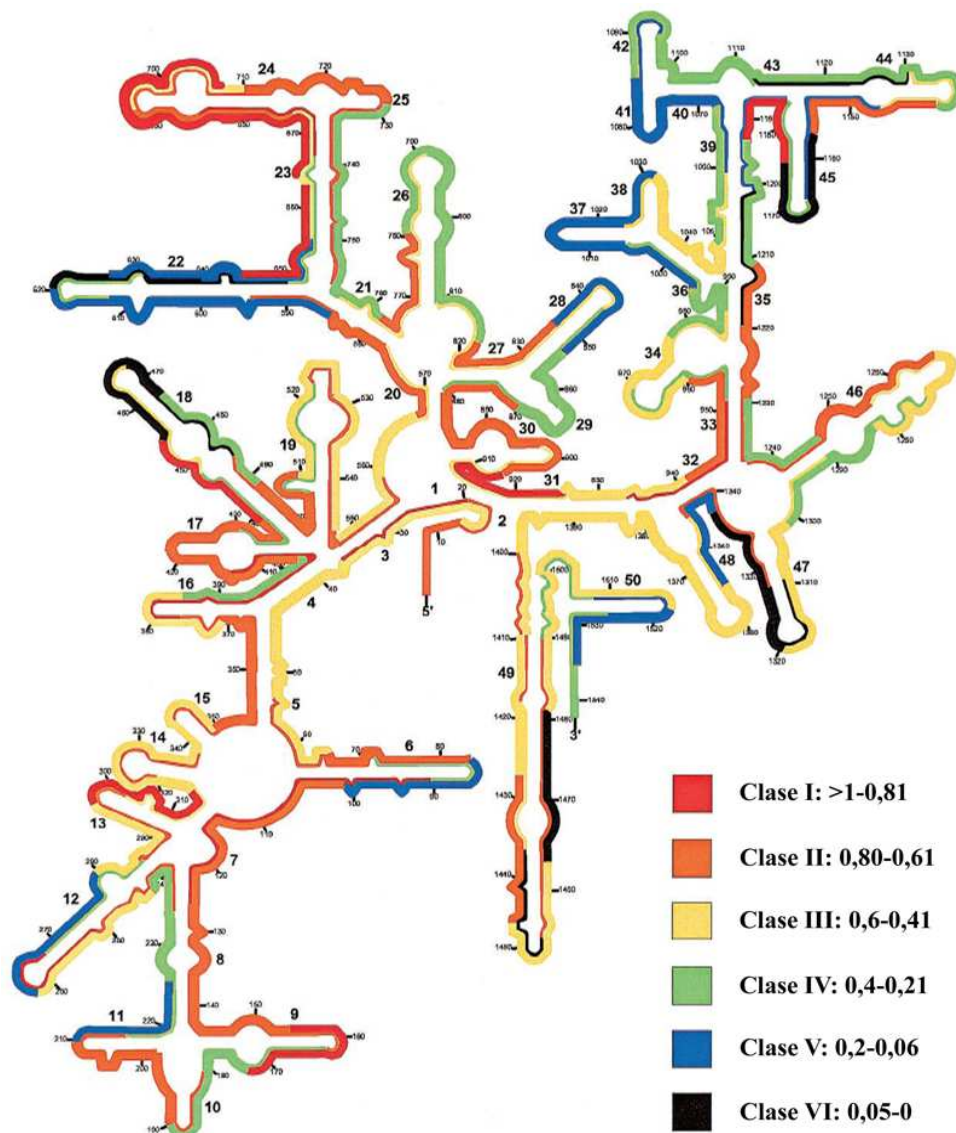


Figura 7.2: Estructura establecida del ARNr 16S de *E. coli* (Fuchs et al., 1998). Se muestra la distribución de las intensidades relativas de hibridación fluorescente de 176 sondas. Los colores indican la intensidad de la señal, considerando el valor 1,0 como el 100%, como está explicado en la clave (Behrens et al., 2003).

La biodegradación de compuestos orgánicos clorados por lodo anaerobio a menudo ha resultado incompleta, por lo que el aporte de cepas que específicamente realicen dechloración reductiva puede ser beneficioso para la eficiencia del proceso. Así, la bioaumentación de un reactor UASB con *Dehalospirillum multivorans* permitió la transformación de tetracloroetileno en dicloroetileno, en comparación con un reactor UASB control en el que la transformación llegó tan sólo hasta tricloroeteno (Horber et al., 1998). Christiansen y Ahring (1996) inocularon lodo anaerobio estéril con *Desulfitobacterium hafniense*, mostrando la capacidad de esta especie para dechlorar PCP. Se ha comprobado que los microorganismos del género *Desulfitobacterium* son capaces de desarrollarse en presencia de compuestos clorados en lodo granular sin necesidad de ser bioaumentado, llegando a ser dominantes dentro del dominio *Bacteria* (Lecouturier et al., 2003; Lanthier et al., 2005; Yang et al., 2005b). De hecho, estos microorganismos suelen aparecer en suelos contaminados con compuestos orgánicos clorados (Lanthier et al., 2001; Villemur et al., 2006). Las cepas alóctonas inoculadas en reactores anaerobios no siempre proliferan debido a fenómenos de competencia y adaptación (Christiansen y Ahring, 1996; Bouchez et al., 2000a, 2000b). El éxito de la bioaumentación puede verse favorecido si las cepas introducidas establecen relaciones sintróficas, comensuales o mutualísticas con otros microorganismos autóctonos (Lanthier et al., 2002).

El objetivo de este capítulo es analizar mediante FISH la evolución de cepas de *Desulfitobacterium* y de las arqueas metanogénicas presentes en los tres reactores estudiados en el Capítulo 7. Este estudio se acompaña de un análisis morfológico mediante SEM de la evolución tanto del lodo granular como del carbón activo, y de un análisis de la proporción de SSV presentes en ellos.

7.2 Materiales y métodos

7.2.1 Fuente de biomasa y métodos analíticos

La biomasa utilizada para el estudio microbiológico se extrajo directamente de los reactores EGSB (lodo granular) y FBBR (carbón activo) descritos en el Capítulo 6. Se tomaron muestras los días 0, 30, 62 y 248 del experimento, contando a partir de la bioaumentación de los reactores EGSB-Bio y FBBR. El crecimiento de las cepas de *Desulfitobacterium* utilizadas como control en el análisis FISH se realizó de la misma forma que se ha descrito en el Capítulo 6. Para la determinación de los SSV del lodo anaerobio se siguió el protocolo descrito en el [APHA Standard Methods \(1992\)](#).

7.2.2 Hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH)

7.2.2.1 Fijación

El lodo granular fresco (0,03 g) se resuspendió en 890 μL de disolución tampón de fosfatos (PBS) (130 mM NaCl, 10 mM Na_2PO_4 / NaH_2PO_4 , pH = 7,2 – 7,4) y se disgregó por sonicación (potencia media 0,50 w, frecuencia 0,9 ciclos seg^{-1}) durante 30 seg. Se añadieron 108 μL de formaldehído hasta una concentración final del 4%, y se dejó fijando durante 4 h a 4 °C ([Amman, 1990a, 1990b, 1995](#)). La mezcla se centrifugó 5 min a 13000 rpm y el precipitado se resuspendió en 1000 μL de PBS. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones y el sedimento resultante se resuspendió en 1000 μL en Etanol:PBS (1:1) y se conservó a -20 °C.

7.2.2.2 Hibridación

Se emplearon diluciones al 50% de la muestra fijada. Se añadieron 8 μL por pocillo de un portaobjetos excavado multipocillos (ϕ 0,5 cm. FEDELCO, ER-308). La muestra se

secó a 46 °C durante 15 min y sucesivamente se deshidrató en disoluciones de etanol (50, 80 y 100%) durante un tiempo de 3 min, cada una de ellas. Se dejó secar a temperatura ambiente y se le añadió 8 µL de tampón de hibridación (Tablas 7.1 y 7.2) y 2 µL de cada sonda ensayada (Tabla 7.3). La muestra se hibridó a 46 °C durante 3 h. El tampón de hibridación se eliminó con el tampón de lavado (Tabla 7.1) a 48 °C durante 15 min. Las muestras se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1 mg mL⁻¹), durante 3 min y el exceso de DAPI se lavó primero con H₂O Milli-Q y luego con etanol al 70%. Las muestras hibridadas finalmente obtenidas se conservaron a -20 °C.

7.2.2.3 Análisis y cuantificación de células por microscopía y edición de imágenes

Las muestras hibridadas se observaron con un microscopio de epifluorescencia (Axioskop, Zeiss, Oberkochen, Alemania) equipado con filtros para 2-[3-[1-[6-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-6-oxohexil]-1,3-dihidro-3,3-dimetil-5-sulfo-2H-indol-2-iliden]-1-propen-1-il]-1-etil-3,3-dimetil-5-sulfo- (Cy3) (G-2A, λ=550-570) y DAPI (UV-2A, λ=359-461) y una cámara digital. Se fotografiaron campos al azar de la tinción DAPI y su correspondiente hibridación con las sondas marcadas con Cy3. Las imágenes se trataron con el programa informático Adobe® Photoshop CS3 para facilitar la contabilización. La cepa *D. hafniense* PCP-1 se utilizó como control positivo para la hibridación con las sondas Eub388, Dsf326, Dsf576 y Dsf177, y como control negativo para la hibridación con la sonda Arc915. Las imágenes de estos controles sirvieron de patrón para ajustar los niveles de entrada del canal RGB, eliminando de esta forma las bacterias y partículas desenfocadas y las no hibridadas que presentaban autofluorescencia. Se pasó un filtro de ruido desenfocando los detalles en un 20% para eliminar el ruido de fondo. Las muestras se cuantificaron manualmente, a partir de las imágenes resultantes, contrastando mediante encuadre de 5x5 píxels² las imágenes de la tinción DAPI con las imágenes de la hibridación con las sondas marcadas con Cy3. Los valores medios fueron obtenidos a partir de los contajes de 20 campos por cada hibridación, lo que idealmente debería corresponder a un total de entre 800 y 1000 células marcadas con DAPI.

Tabla 7.1: Composición química del tampón de hibridación y del tampón de lavado. (Los valores de X,Y,Z se indican en la Tabla 7.2) (Amann, 1995).

Tampón de Hibridación	Concentración	Cantidad
NaCl	5 M	360 µL
Tris – HCl	1 M (pH = 8)	40 µL
Formamida	100%	X
SDS	10%	2 µL
Agua Milli-Q	PURA	Hasta 2000 µL
Tampón de lavado	Concentración	Cantidad
NaCl	5 M	Y
Tris – HCl	1 M (pH = 8)	1000 µL
EDTA	0.5 M (pH = 9)	Z
SDS	10% _{v/v}	50 µL
Agua Milli-Q	PURA	Hasta 50 mL

Tabla 7.2: Valores de X, Y, Z . Estos dependen del porcentaje de formamida utilizada para cada sonda (Amann, 1995).

Formamida (%)	X (µL)	Y (µL)	Z (µL)
0	0	9000	0
5	100	6300	0
10	200	4500	0
15	300	3180	0
20	400	2150	500
25	500	1490	500
30	600	1020	500
35	700	700	500
40	800	460	500
45	900	300	500
50	1000	180	500
55	1100	100	500
60	1200	40	500
65	1300	0	500
70	1400	0	350
75	1500	0	250
80	1600	0	175
85	1700	0	125
90	1800	0	88
95	1900	0	62

Tabla 7.3: Características de las sondas utilizadas.

Sonda	Secuencia (5'- 3')	Clase ARNr 16S	FA (%)	Especificidad	Referencia
<i>Eub338</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	I-III	35	Bacteria	Amann et al., 1990b
<i>Arc915</i>	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	I	20	Arquea	Stahl et al., 1991
<i>NON338</i>	ACTCCTACGGGAGGCAGC	I-III	35	Control negativo Arquea	Amann et al., 1990b
<i>Dsf326</i>	GCGGATCCATCTACTAACG	IV	30	<i>Desulfitobacterium</i> spp.	Lanthier et al., 2002
<i>Dsf576</i>	CCGTCATGTAAGTACATTA	III	20	<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	Lanthier et al., 2002
<i>Dsf177</i>	CCACCGATTAAGCTCATC	IV	20	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> PCP-1	Esta tesis

7.2.2.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El análisis de la morfología de los gránulos y de las biopelículas formadas sobre carbón activo de los reactores EGSB-C, EGSB-Bio y FBBR, respectivamente, se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Capítulo 2.

7.3 Resultados y discusión

7.3.1 Evolución del contenido en SSV en los gránulos anaerobios y el carbón activo

En la Figura 7.3 se muestra la evolución temporal del porcentaje de SSV en los reactores EGSB-C, EGSB-Bio y FBBR durante el periodo de experimentación. Se observó una disminución en el porcentaje de SSV en ambos reactores EGSB, probablemente debido a la acumulación de sales depositadas sobre los gránulos y a la mineralización de parte de la biomasa como consecuencia de la muerte celular provocada por el efecto tóxico del 246TCP a lo largo del periodo de experimentación. En cambio, en el reactor FBBR el porcentaje de SSV aumento hasta el 6,1%, debido a la colonización de los microorganismos y a la formación de la biopelícula sobre la superficie del carbón activo.

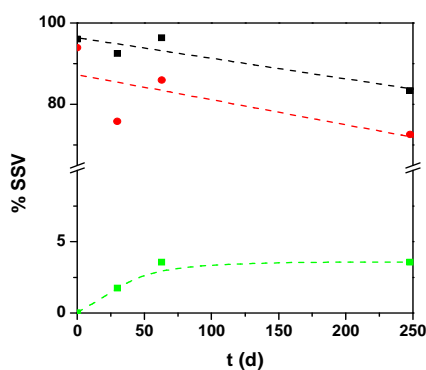


Figura 7.3: Evolución del porcentaje de SSV respecto a los SST en los reactores EGSB-C (■), EGSB-Bio (●) y FBBR (▲) durante el periodo de experimentación en continuo.

7.3.2 Evolución de la estructura de los gránulos y del carbón activo. *Colonización del carbón activo.*

El análisis estructural tanto de los gránulos de los reactores EGSB-C y EGSB-Bio como de las partículas de carbón activo en el reactor FFBR se analizó mediante SEM (Figuras 7.4 y 7.5). Se observa una gran diversidad de morfologías microbianas en ambos reactores tanto en el inóculo inicial como al final del experimento, como muestran las Figuras 7.4a, 7.4c en el reactor EGSB-C y las Figuras 7.5a y 7.5c en el reactor EGSB-Bio.

La morfología de los microorganismos situados en el interior de los gránulos permaneció bastante homogénea, debido a que dentro de los gránulos se suelen encontrar básicamente arqueas del género *Methanosaeta* (Díaz et al., 2006), que podrían corresponder con los organismos filamentosos que se aprecian. Las densidades celulares internas de los gránulos de los reactores EGSB permanecieron inalteradas durante el periodo de experimentación, como se puede observar en las Figuras 7.4b y 7.4d (reactor EGSB-C) y en las Figuras 7.5b y 7.5d (reactor EGSB-Bio). La estratificación granular no se vio alterada en ninguno de los reactores EGSB, como puede verse en las micrografías de los cortes granulares (Figura 7.4e y 7.4f en el reactor EGSB-C y Figuras 7.5e y 7.5f en el reactor EGSB-Bio), aunque en el reactor EGSB-Bio aparecieron oquedades y grietas al final del proceso en continuo, lo que puede ser un indicio de desintegración granular.

Por otra parte, en la Figura 7.6 se muestra la evolución de la estructura de la superficie granular en los reactores EGSB. Se puede apreciar que el inóculo inicial contenía una lámina superficial rugosa y poco compacta de microorganismos que desapareció en el momento en que la recirculación en los reactores se puso en marcha (Figuras 7.6a y 7.6b), probablemente debido al arrastre hídrico y a rozamiento entre los gránulos, lo que provocó que los microorganismos con menor fuerza de adhesión desapareciesen de la morfología granular. Esta lámina superficial se desarrolló de nuevo posteriormente, hasta alcanzar la estructura inicial (Figura 7.6c), probablemente tras el restablecimiento del equilibrio entre las fuerzas de arrastre y las fuerzas de adhesión. Este hecho pudo afectar, como se verá con posterioridad, en la evolución de la concentración de las cepas *Desulfotobacterium* spp. inoculadas en el reactor EGSB-Bio.

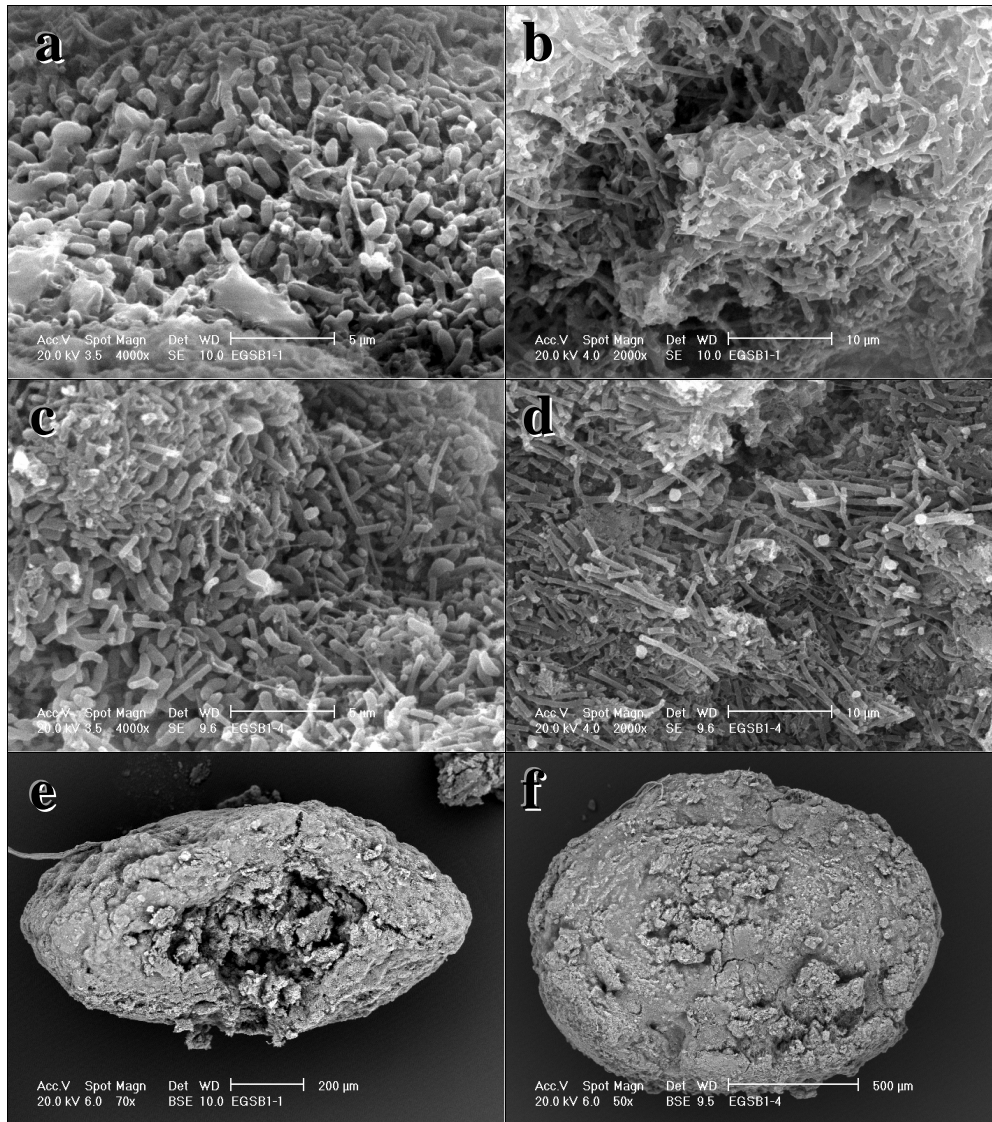


Figura 7.4: Estructura de los gránulos del reactor EGSB-C. Detalles de la estructura exterior (a y c), interior (b y d) y morfología de un corte granular (e y f) en la puesta en marcha y tras 248 d de experimentación, respectivamente.

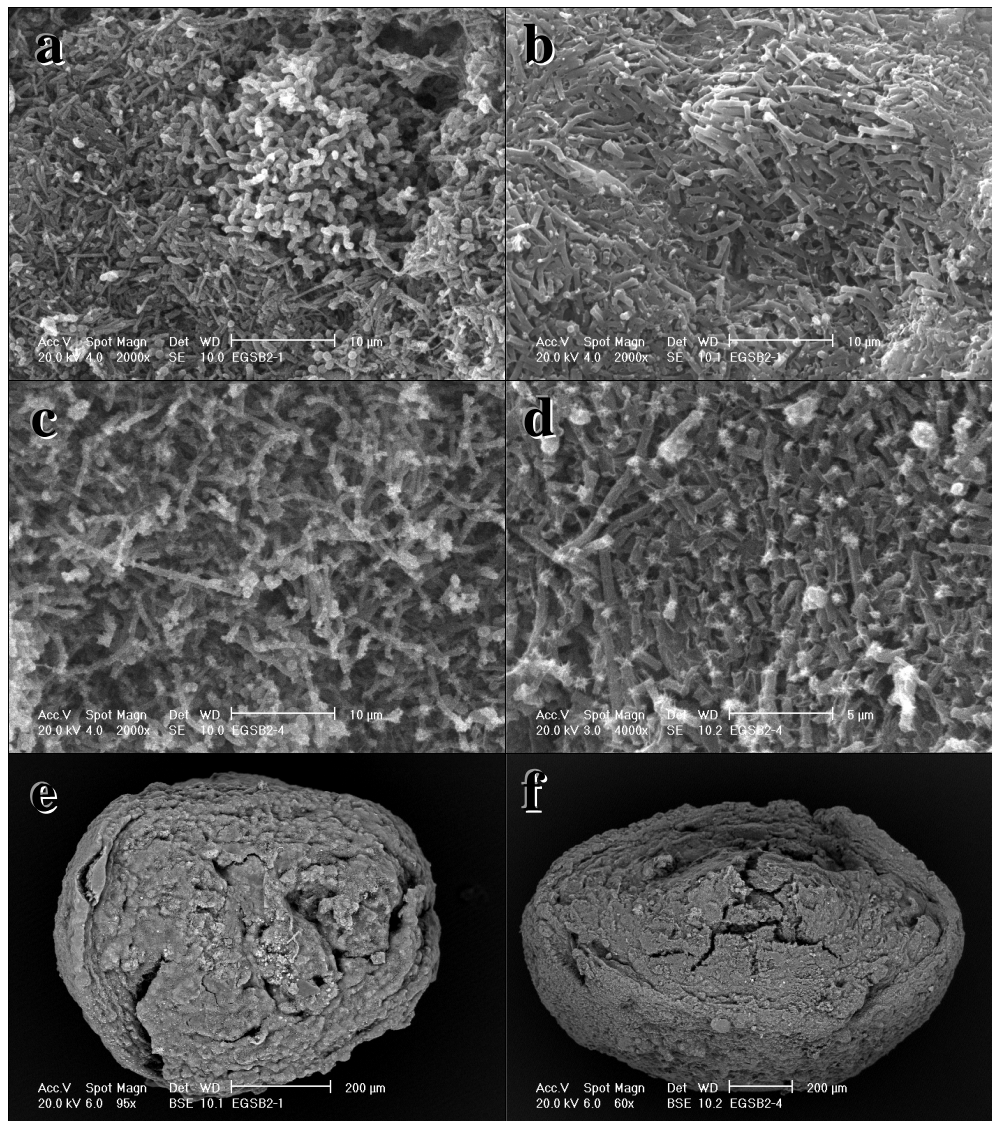


Figura 7.5: Estructura de los gránulos del reactor EGSB-Bio. Detalles de la estructura exterior (a y c), interior (b y d) y morfología de un corte granular (e y f) en la puesta en marcha y tras 248 d de experimentación, respectivamente.

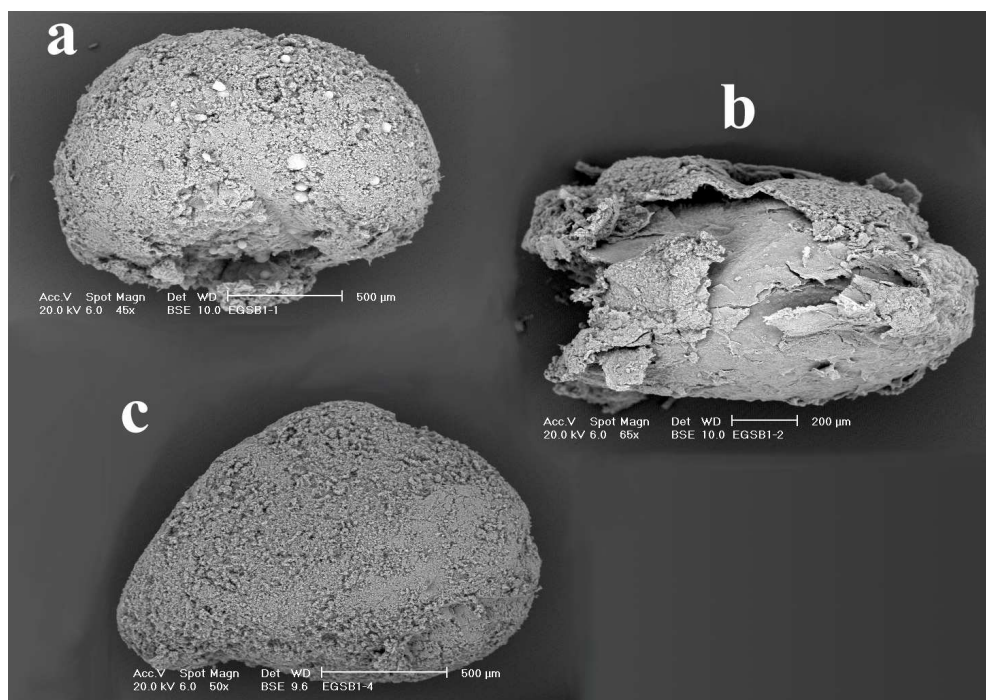


Figura 7.6: Estructura de la superficie de los gránulos extraídos de los reactores EGSB al comienzo del experimento (a), después de 30 d (b) y después de 268 d (c) de experimentación.

El desarrollo de la biopelícula anaerobia sobre la superficie del carbón activo en el reactor FBBR se muestra en la Figura 7.7. Se observa un desarrollo irregular, debido probablemente al arrastre de los microorganismos por la elevada recirculación, lo que implicó una recolonización del carbón activo una vez se alcanzó el equilibrio entre microorganismos adheridos y microorganismos lavados. Este equilibrio permitió el desarrollo de una biopelícula madura, como puede verse en la Figura 7.7d, tras 248 d de experimentación. El desarrollo de esta biopelícula influyó en la diferencia de la capacidad de adsorción observada en el carbón activo (ver Capítulo 6). En las Figuras 7.7e y 7.7f se pueden apreciar los cambios en la morfología de los gránulos de carbón activo tras el desarrollo de la biopelícula. La superficie de los gránulos perdió oquedades y angulosidades.

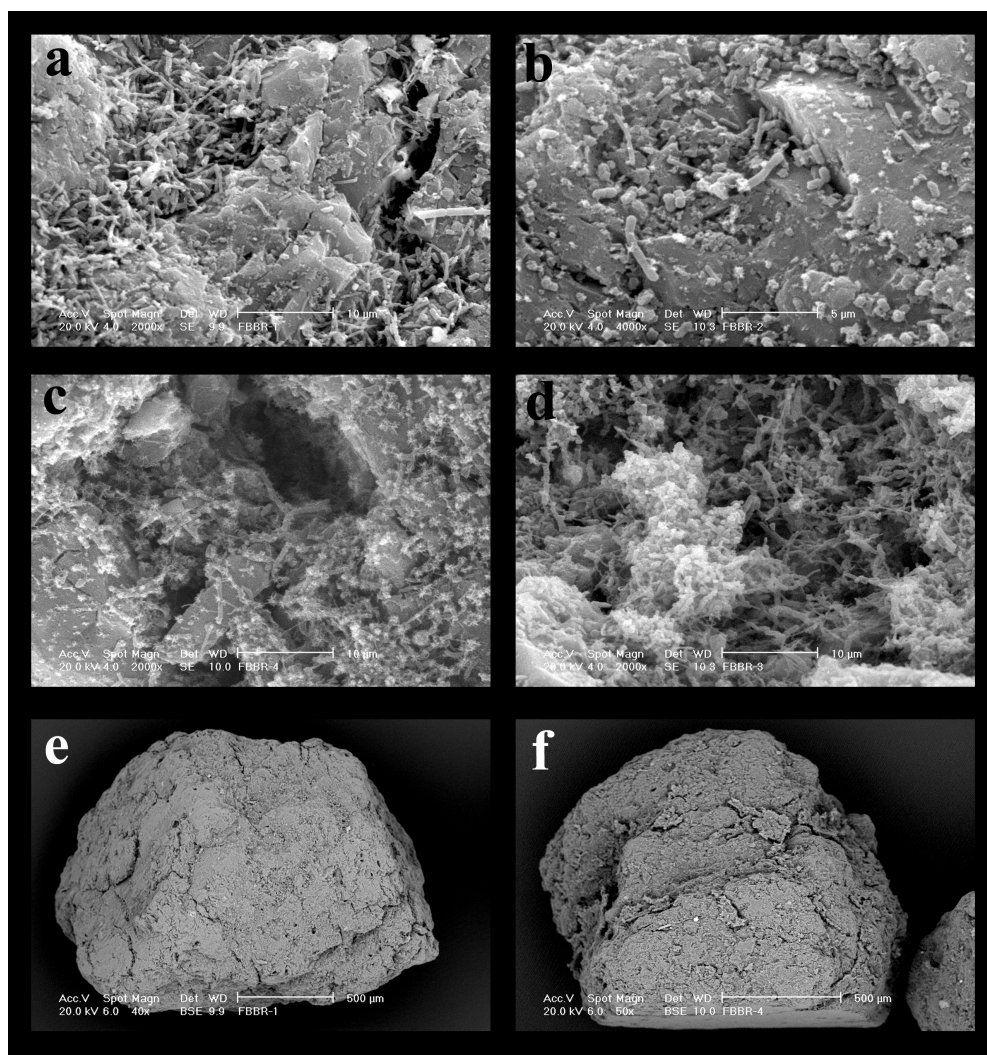


Figura 7.7: Evolución de la colonización del carbón activo en el reactor FBBR durante el periodo experimental en los días 0 (a), 30 (b), 62 (c) y 248 (d). Estructura de una partícula de carbón activo en la puesta en marcha del reactor (e) y tras 248 d de experimentación (f).

7.3.3 Análisis por FISH

7.3.3.1 Optimización y puesta a punto de las sondas

Se utilizaron las sondas Arc915, Eub338, Dsf326 y Dsf576 (Tabla 7.3), específicas para el dominio *Archaea*, *Eubacteria*, para el género *Desulfitobacterium* y para la especie *D. Hafniense*, respectivamente. Se diseñó la sonda Dsf177 específica para *D. Hafniense* PCP-1 a través de la función PROBE_FUNCTION del programa informático ARB y su especificidad se evaluó mediante la función PROBE_MATCH. Las sondas Dsf576 y Dsf177 permiten diferenciar cuantitativamente las dos cepas pertenecientes a la especie *D. hafniense* (PCP-1 y TCP-A) inoculadas en los reactores EGSB-Bio y FBBR. Se testó la sonda utilizando cultivos puros en crecimiento exponencial de dichas cepas y se observó que la sonda no hibridaba correctamente con ninguna de las dos cepas, por lo que se descartó su uso en el análisis cuantitativo. No obstante, esta sonda no debe descartarse para futuros usos, ya que se puede mejorar la penetración de la misma y la hibridación mediante deposición catalizada de genes indicadores - FISH (CaRD-FISH). La bondad de la metodología se evaluó utilizando las sondas Eub338 y Arc915 como control positivo en las hibridaciones del género *Desulfitobacterium* y del dominio *Archaea*, respectivamente, y empleando la sonda NON338 como control negativo de hibridación del género *Desulfitobacterium*.

7.3.3.2 Cuantificación de microorganismos

Se estudiaron muestras de los reactores EGSB-C, EGSB-Bio y FBBR a distintos tiempos de operación (0, 30, 62 y 248 d, coincidentes con los muestreos SEM) con el objetivo de estudiar la evolución tanto de las cepas de *Desulfitobacterium* inoculadas en los reactores EGSB-Bio y FBBR como de las arqueas en sendos reactores. La mayoría de las arqueas presentes en reactores anaerobios corresponde con metanógenos, por lo que las hibridaciones con la sonda Arc915 sirvieron para cuantificar la calidad metanogénica de los reactores. Debido a su especificidad, con la sonda Dsf576 se cuantificó la especie *Desulfitobacterium hafniense*, y el género entero con la sonda Dsf326. La diferencia entre las bacterias hibridadas con ambas sondas se contabilizó como la suma de todas las especies *Desulfitobacterium*

restantes, aunque se asumió que estas bacterias pertenecían a la especie *D. chlororespirans*. La Figura 7.8 muestra un resumen de esta cuantificación.

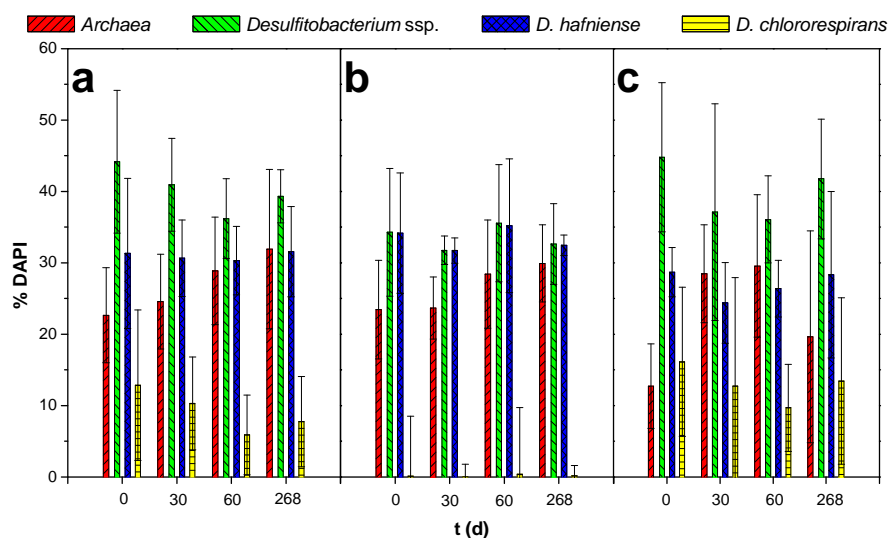


Figura 7.8: Evolución temporal de Arquea, *Desulfitobacterium*, *D. hafniense* y *D. chlororespirans* en el reactor EGSB-Bio (a), EGSB-C (b) y FBBR (c). Las barras de error representan desviaciones estándar de la media de 20 contajes de campos.

i) Metanógenos (sonda Arc915)

En la Figura 7.9 se muestran hibridaciones con la sonda Arc915 para los tres reactores. La adecuada calidad de las hibridaciones indica que los metanógenos presentaban gran actividad ribosómica en el momento de su fijación, lo cual implica que su actividad no sufrió un importante deterioro por la presencia del 246TCP. De hecho, el porcentaje de arqueas en los reactores EGSB se incrementó a lo largo del periodo de operación, siendo este incremento mayor en el reactor EGSB-Bio, en el cual se cuantificó una proporción del $32 \pm 11\%$ tras 248 d, con un incremento del 45% respecto de la proporción inicial. Este aumento

permite justificar que la actividad metanogénica del reactor EGSB-Bio fuese mayor que la del EGSB-C (ver Capítulo 6).

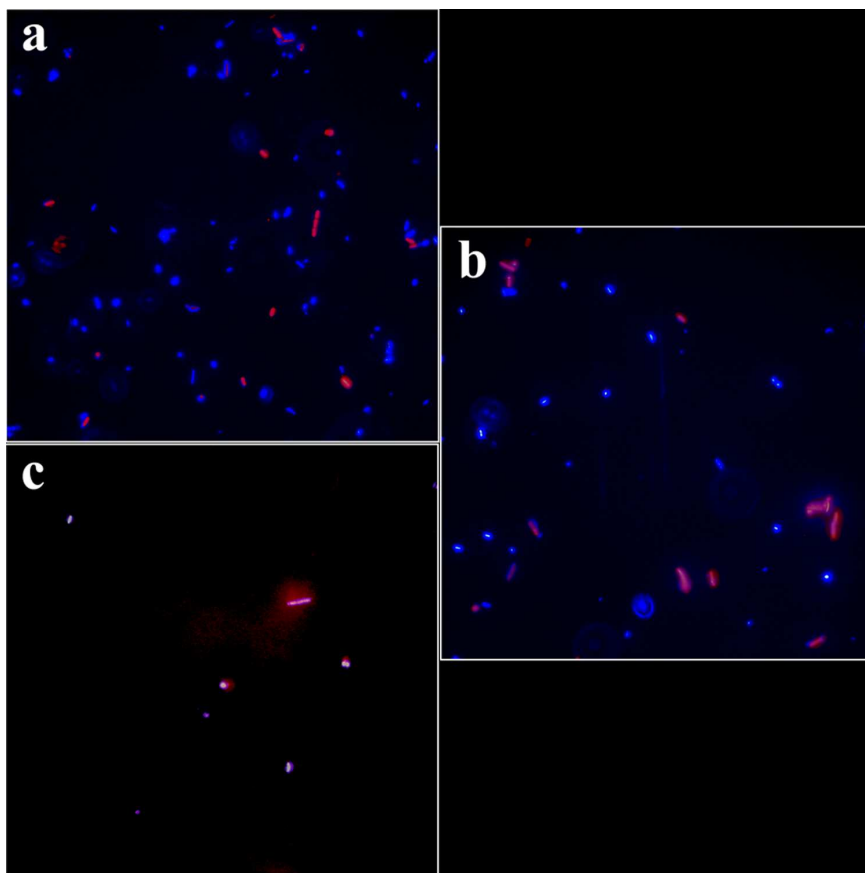


Figura 7.9: Superposición de imágenes DAPI y Cy3 de las hibridaciones con sondas específicas para *Archaea*: EGSB-C, día 62 (a); EGSB-Bio, día 62 (b) y FBBR, día 0 (c).

El desarrollo de la comunidad metanogénica en el reactor FBBR sucedió de forma gradual. Inicialmente, después del periodo de bioaumentación de 12 d, el porcentaje de arqueas presentes en el carbón activo era del $13 \pm 6\%$, lo que indica que durante el periodo de bioaumentación se desarrolló casualmente la comunidad metanogénica, seguramente debido a contaminaciones externas (el reactor FBBR no estaba en condiciones estériles). Esta

comunidad fue creciendo hasta alcanzar el $20 \pm 15\%$ del total de microorganismos después de 248 d de operación. Al comparar la evolución de los microorganismos metanógenos con la evolución en la eficiencia de consumo de DQO obtenida en el reactor FBBR (ver Capítulo 6) se puede concluir que, a pesar de no haber cuantificado metano en este reactor, el desarrollo de la comunidad metanogénica supuso un aumento en la eficiencia de consumo de DQO y, por tanto, una mejora en la producción de metano, ya que los metanógenos son los únicos microorganismos cuantitativamente relevantes que mineralizan la materia orgánica en ambientes anaerobios, pues las bacterias fermentadoras sólo realizan transformaciones parciales.

ii) Género *Desulfitobacterium* (Sonda Dsf326)

Las fotografías de la Figura 7.10 muestran ejemplos de hibridaciones de muestras de los tres reactores con la sonda Dsf326. Debido a que esta sonda hibrida en una zona IV del ARNr 16S (Tabla 7.3), la intensidad de hibridación es bastante menor que con la sonda Arc915. Los resultados de las hibridaciones y los contejes en el reactor EGSB-C muestran que, desde el primer momento, el lodo contenía una importante cantidad de bacterias del género *Desulfitobacterium*, en torno al $34 \pm 9\%$. El origen de estos microorganismos no está claro. Una explicación posible es que, debido a que el lodo utilizado como inóculo estaba constituido por una mezcla de lodo proveniente del reactor EGSB que trató 24DCP (Capítulo 2) y lodo originario de una industria papelera, las bacterias del género *Desulfitobacterium* estuviesen ya bien establecidas en el inóculo inicial. El enriquecimiento posterior durante la etapa de bioaumentación de los reactores EGSB-Bio y FBBR sirvió para que estas bacterias se adaptasen a la decloración del 246TCP. Por tanto, en el inicio del proceso en continuo constituían ya un grupo dominante. Se han dado casos de desarrollo de *Desulfitobacterium* tanto en reactores anaerobios (Breitenstein et al., 2001; Yang et al., 2005b) como en ambientes naturales contaminados con clorofenoles (Lanthier et al., 2001), lo que indica que el género está capacitado para competir y dominar en este tipo de ambientes. La evolución posterior de la presencia de *Desulfitobacterium* en el reactor EGSB-C, que se mantuvo entre el 31 y el 35% del total de microorganismos teñidos con DAPI, afianza así la hipótesis de dominancia de este género cuando en el medio existen clorofenoles.

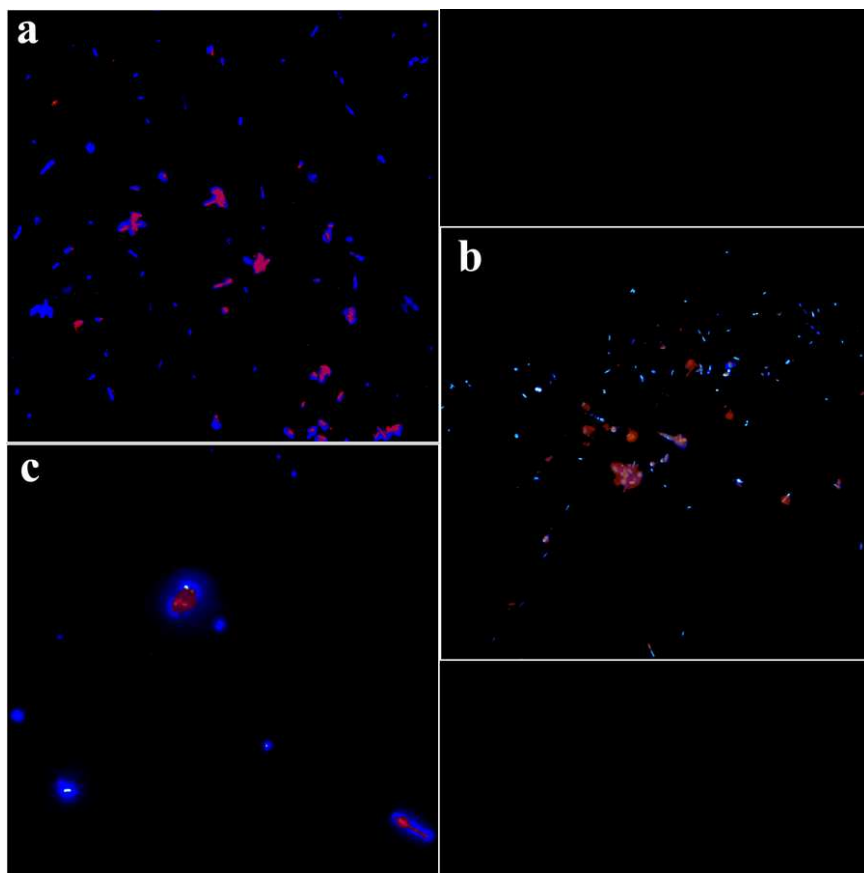


Figura 7.10: Superposición de imágenes DAPI y Cy3 de las hibridaciones con sondas específicas para *Desulfitobacterium*: EGSB-C, 248 d (a); EGSB-Bio, 0 d (b) y FBBR, 62 d (c).

En el reactor EGSB-Bio la bioaumentación inicial aumentó el porcentaje de bacterias del género *Desulfitobacterium* hasta un valor en torno a $44 \pm 10\%$ del total teñido con DAPI, lo cual indica que se aumentó el porcentaje de este género en 14 puntos porcentuales respecto al inóculo (lodo del reactor EGSB-C). Durante los primeros 62 d de operación esta cantidad disminuyó debido a que, por un lado, los reactores estuvieron sometidos a cargas relativamente bajas de 246TCP durante estos días, lo que promovió el crecimiento de otras bacterias y, por otro lado, la elevada velocidad ascensional causó que parte de la biomasa *Desulfitobacterium* se perdiese por lavado (Figura 7.6). En cualquier

caso, la proporción de *Desulfitobacterium* incrementó nuevamente hasta alcanzar valores similares a los iniciales cuando se alcanzó el equilibrio entre la biomasa lavada y la biomasa adherida. Esto confirma el predominio del género en ambos reactores, y supone el primer estudio en el que se muestra que el género *Desulfitobacterium* ostenta una dominancia absoluta dentro del dominio *Bacteria* en reactores anaerobios que tratan aguas residuales contaminadas con clorofenoles.

En el reactor FBBR, tras la bioaumentación inicial el género se situó como dominante absoluto dentro de la biopelícula del carbono activo, con un porcentaje del $45 \pm 10\%$. Durante los dos meses siguientes de experimentación este valor se redujo ligeramente, aunque al finalizar el periodo de estudio (día 248) el porcentaje del género se recuperó, alcanzando un valor de $42 \pm 8\%$ del total de células teñidas con DAPI. Este valor supera con creces el establecido en un trabajo anterior en el que se inoculó la cepa *Desulfitobacterium hafniense* PCP-1 en un reactor FBBR con carbón activo que se utilizó para tratar PCP (Lanthier et al., 2005). En dicho trabajo se estableció que la cantidad de bacterias de esta especie estuvo en torno al $19 \pm 6\%$ tras 225 d de operación, mientras que el dominio *Bacteria* supuso el $70 \pm 12\%$. Esta diferencia se debe a que la velocidad ascensional aplicada en este trabajo es mucho mayor que la aplicada en el citado trabajo (10 frente a $0,03 \text{ m h}^{-1}$). Se conoce que el género *Desulfitobacterium* tiende a formar biopelículas debido a su gran facilidad de adhesión a partículas inorgánicas, superficies u otros microorganismos derivada de la excreción de mucopolisacáridos (Villemur et al., 2006). Así, la utilización de valores elevados de velocidad ascensional favorece el desarrollo de microorganismos con gran capacidad de adhesión. En cualquier caso, tanto en el presente trabajo como en el estudio de Lanthier et al. (2005), se dedujo que el género *Desulfitobacterium* llega a ser dominante en la comunidad de la biopelícula adherido al carbón activo, lo que implica que la presencia de clorofenoles en el medio también favorece el desarrollo del género.

iii) *Desulfitobacterium hafniense* (Sonda Dsf576)

En la Figura 7.11 se muestran ejemplos de hibridaciones en muestras obtenidas de los tres reactores con la sonda Dsf576. Es llamativa la menor intensidad de señal de la

hibridación con esta sonda, lo cual ha sido previamente documentado al situarse la sonda en zona IV del ARNr 16S (Lanthier et al., 2005).

En el reactor EGSB-C no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el número de microorganismos hibridados con esta sonda y con la sonda Dsf326. Ello permite afirmar que prácticamente la totalidad de los microorganismos pertenecientes al género *Desulfitobacterium* pueden incluirse dentro de la especie *D. hafniense*.

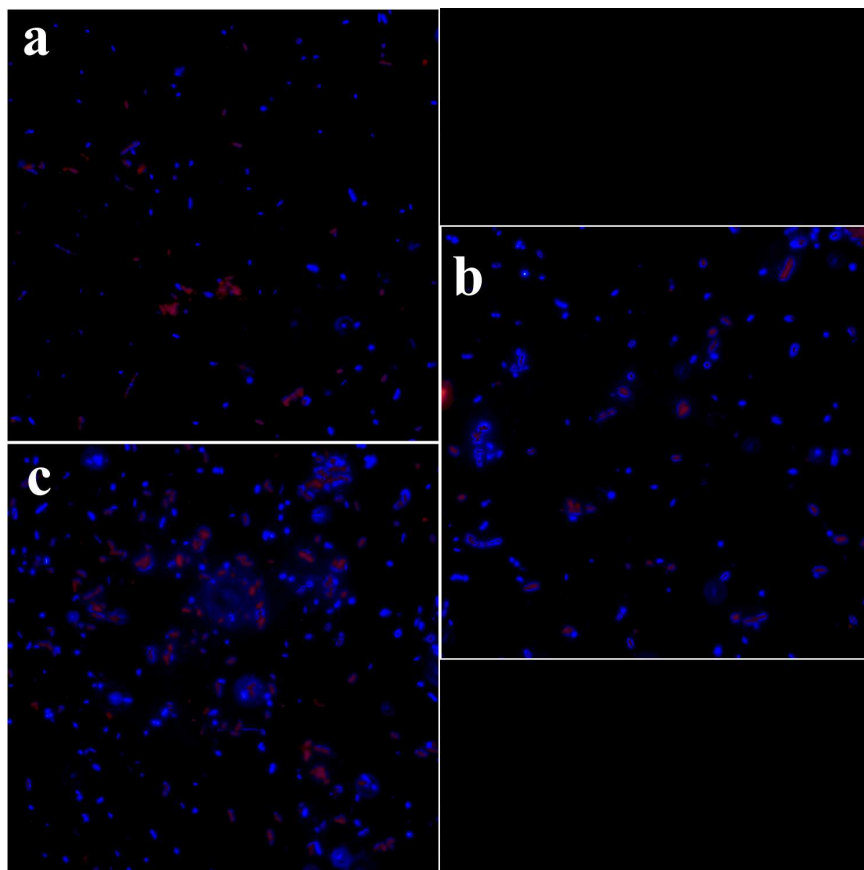


Figura 7.11: Superposición de imágenes DAPI y Cy3 de las hibridaciones con sondas específicas para *D. hafniense*: EGSB-C, 62 d (a); EGSB-Bio, 0 d (b) y EGSB-Bio, 62 d (c).

En los reactores EGSB-Bio y FBBR sí existieron diferencias significativas entre ambas hibridaciones, lo que significa que se desarrollaron otras especies del género. La

mayoría seguramente pertenecen a la otra especie con la que se bioaumentó, *D. chlororespirans*. Aunque la cantidad másica inicial con la que se bioaumentaron ambos reactores fue de 1/3 respecto del total de las tres cepas (véase Capítulo 7.2), se encontró una proporción inferior en el reactor EGSB-Bio al inicio del proceso, lo cual confirma que en el inóculo inicial de los reactores EGSB estaba presente la especie *D. hafniense*. En el reactor FBBR, en cambio, la proporción inicial de *D. chlororespirans* se situó en torno al 42% del género *Desulfitobacterium*, lo cual implica que durante el periodo de 12 d de bioaumentación, la especie *D. chlororespirans* se estableció más rápidamente en el carbón activo que las otras dos cepas bioaumentadas. Este hecho se explica por la mayor tasa de crecimiento de la especie *D. chlororespirans* (Sanford et al., 1996; Breitenstein et al., 2001), lo cual se puede comprobar si se observa el crecimiento de las tres cepas en la Figura 6.2 (Capítulo 6). Durante los 60 primeros días de experimentación en continuo la proporción de *D. chlororespirans* disminuyó drásticamente. Al finalizar este periodo (día 248), la proporción se situaba en el 32% del total del género *Desulfitobacterium*, coincidiendo con las mayores velocidades de carga de 246TCP aplicadas en los reactores. Así, se sugiere que esta especie soporta mayores concentraciones del 246TCP que la especie *D. Hafniense*.

7.3.3.3 Relevancia de la especie *D. chlororespirans* en el cómputo global del proceso

Los reactores EGSB-Bio y FBBR mostraron mayor estabilidad que el reactor EGSB-C tras someterlos a condiciones de toxicidad extremas (Capítulo 6). Para intentar comprender el motivo microbiológico de estos resultados, hay que fijarse en la proporción de microorganismos presentada en la Figura 7.8. Las muestras correspondientes al día 248 se extrajeron de los tres reactores inmediatamente antes a la realización de los ensayos de toxicidad extrema, por lo que la estructura microecológica descrita mediante el análisis FISH puede considerarse la misma que trabajó durante estos ensayos. Además, como ha quedado establecido en este Capítulo, la principal diferencia entre el reactor EGSB-C y los reactores EGSB-Bio y FBBR es la presencia de la especie *D. chlororespirans* en estos últimos.

Dado que no se puede justificar la mayor estabilidad de los reactores simplemente por la bioaumentación, ya que el inóculo inicial contenía una elevada proporción de la especie

D. hafniense, la explicación más coherente es que la especie *D. chlororespirans* resultó clave en la mejora del proceso. Como se ha comentado esta especie presenta velocidades de crecimiento más elevadas que la especie *D. hafniense*. Suponiendo que los valores de rendimiento de la biomasa sean similares en ambas especies, lo cual resulta coherente teniendo en cuenta que pertenecen al mismo género, una mayor velocidad de crecimiento implica una mayor velocidad de consumo de sustrato y, por consiguiente, una mayor velocidad de utilización de aceptor de electrones, es decir, de 246TCP. Por ello, en los reactores EGSB-Bio y FBBR la actividad de *D. chlororespirans* en los últimos días del periodo operacional y, sobre todo, durante los ensayos de toxicidad extrema, resultó determinante para asegurar que las concentraciones de 246TCP y 24DCP se situasen en valores admisibles por el resto de microorganismos presentes en las biopelículas o en los biogránulos y, de esta manera, permitir la posterior recuperación de su actividad cuando la velocidad de carga de 246TCP disminuyó hasta alcanzar concentraciones no inhibitorias en el interior de los reactores.

CAPÍTULO 8

CINÉTICA DE LA BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA DE 246TCP



Es increíble que la matemática, habiendo sido creada por la mente humana, logre describir la naturaleza con tanta precisión.

A. Einstein

Resumen:

Se ha estudiado el tratamiento en discontinuo del 246TCP utilizando lodo granular anaerobio procedente de dos reactores EGSB que habían estado sometidos hasta un concentración de 65 mg 246TCP L⁻¹. Uno de estos reactores había sido bioaumentado con 3 cepas del género *Desulfitobacterium* (*D. hafniense* PCP1, *D. hafniense* TCPA y *D. chlororespirans*). Se empleó un agua residual sintética compuesta por una mezcla de cosustratos en un medio mineral al que se añadió concentraciones de 246TCP entre 50-150 mg L⁻¹. Se cuantificó la concentración de 246TCP y sus intermedios de degradación y los compuestos derivados de la fermentación de los cosustratos, así como el metano producido, la DQO y el pH. El 246TCP afectó principalmente a la degradación de acetato y propionato, que estuvieron inhibidos a concentraciones por encima de 75 mg 246TCP L⁻¹. A concentraciones de 246TCP de 150 mg L⁻¹ se acumuló lactato. La metanogénesis siguió un modelo de producción bifásico debido a la acción conjunta de metanógenos acetoclásticos e hidrogenótrofos (diauxia). Se detectó un proceso inhibitorio en la actividad de los primeros que se modelizó mediante una ecuación de primer orden con un término de inhibición acompetitiva. La constante de inhibición (K_i) estimada del modelo alcanzó valores de 41,4 y 35 mg 246TCP L⁻¹ para los reactores con lodo sin bioaumentar y bioaumentado, respectivamente, mientras que el orden de inhibición se situó en un valor de 7. La similitud entre ambos los procesos inhibitorios sobre ambos reactores indicó que la metanogénesis no se vio afectada por la bioaumentación. Por otro lado, la degradación de 246TCP estuvo inhibida para concentraciones superiores a 75 mg L⁻¹. La decloración reductiva del 246TCP sucedió principalmente por vía *orto*, generando sucesivamente 24DCP y 4CP, el cual se acumuló como producto final. Asimismo, se detectó un proceso de adsorción del 246TCP en los gránulos. Se modelizó la ruta de degradación del 246TCP en los ensayos con 50 mg 246TCP L⁻¹, tanto la vía abiótica (cinética de adsorción de 2º orden), como la biótica (Monod). La bondad de ajuste resultó elevada ($R^2 = 0,997$ y $0,973$, respectivamente). Los parámetros de degradación de 246TCP fueron similares en ambos reactores ($V_{max} = 5,3$ y $5,1$ $\mu\text{M h}^{-1}$ y $K_s = 5,8$ y $13,1$ μM , respectivamente). La degradación del 24DCP resultó más lenta en el reactor con lodo bioaumentado que en el reactor control ($V_{max} = 11,9$ y $4,8$ mM h^{-1} , respectivamente) pero este lodo mostró mayor afinidad por este compuesto ($K_s = 31,3$ y $26,9$ μM , respectivamente).

8.1 Introducción

Los compuestos clorofenólicos ejercen una acción inhibitoria sobre los microorganismos anaerobios que se traduce en una reducción de su actividad. El 246TCP es un inhibidor no selectivo, si bien afecta de manera distinta a cada comunidad de microorganismos (Chen et al., 2008). Según Collins et al. (2005), los más afectados son los oxidadores de propionato, seguidos de los metanógenos acetoclásticos e hidrogenótrofos, aunque también se ha demostrado que afecta a la actividad de los oxidadores de butirato y de etanol (Kim et al., 1996). En cualquier caso, parece claro que los metanógenos hidrogenótrofos son los microorganismos que mejor resisten la actividad inhibitoria de este compuesto (Kim et al., 1996). La recuperación de la actividad microbiana es posible hasta concentraciones de 200 mg 246TCP L⁻¹, para la degradación de propionato, y 400 mg L⁻¹, para la del acetato (Perkins et al., 1994).

Habitualmente, la cinética de producción de metano se ha estudiado mediante el modelo de Monod (Kalyuzhnyi, 1997; Borja et al., 2005), por lo que se ha establecido protocolariamente en el modelo ADM1 (Batstone et al., 2002). Para simplificar este modelo se han utilizado cinéticas de primer orden (García-Ochoa et al., 1999), o el conocido modelo de Roediger (Edeline, 1980), que es una simplificación de Monod a un pseudo-primer orden cuando la constante de saturación es muy superior a las concentraciones de sustrato empleadas (Rodríguez-Martínez et al., 2002). La producción de metano por vía acetoclástica e hidrogenotrófica se ha estudiado mediante un modelo diáuxico (Qu et al., 2009), en el que se evaluó el crecimiento los microorganismos responsables de cada etapa (*Methanosaeta* spp. y *Methanosarcina* spp. para la metanogénesis acetoclástica y *Methanosarcina* spp. y otros hidrogenótrofos para la hidrogenotrófica). Por otra parte, es habitual utilizar expresiones del tipo Haldane para predecir episodios inhibitorios sobre la metanogénesis (Lokshina et al., 2001; Pereira et al., 2004; Fountoulakis et al., 2008).

La decoloración reductiva del 246TCP sucede principalmente a través de la vía *orto*, tanto en lodos no adaptados (Takeuchi et al., 2000) como adaptados a la decoloración (Mohn and Kennedy, 1992; Nicholson et al., 1992; Chang et al., 1995), generando consecutivamente 24DCP y 4CP. Los microorganismos principales que realizan este proceso son bacterias

(Chang et al., 1995), muchas de las cuales están relacionadas con las sulfatorreductoras (Kennens et al., 1996), aunque el proceso de sulfatorreducción no tiene por qué ir acoplado a la decoloración (El Fantroussi et al., 1998). Uno de los taxones decoloradores más estudiados es el género *Desulfotobacterium* (Villemur et al., 2006), el cual puede realizar también sulfatorreducción. Las especies *D.chlororespirans* o *D. dehalogenans* realizan decoloración en posición *orto* (Utkin et al., 1995; Sanford et al., 1996), mientras que *D. hafniense* puede realizarla en cualquier posición (Bouchard et al., 1996), aunque se han aislado cepas de esta especie que no son capaces de realizar *para*-decoloración (Breitenstein et al., 2001). La bioaumentación de reactores anaerobios con *Desulfotobacterium* sp. para mejorar la decoloración anaerobia de clorofenoles se ha empleado con cierto éxito (Tartakovsky et al., 1999; Guiot et al., 2002), aunque algunos opinan que es preferible bioestimular una comunidad microbológica para que realice determinada función (El Fantroussi y Agathos, 2005).

Los estudios sobre la cinética de decoloración anaerobia de clorofenoles son contradictorios. Aunque sólo los modelos basados en Haldane son capaces de predecir episodios inhibitorios, se han aplicado los modelos de Monod (Armenante et al., 1999; Magar et al., 1999), Grau y Stover-Kincannon (Sponza y Ulukoy, 2008; Kuscu y Sponza, 2009) y Haldane (Sahinkaya y Dilek, 2007). Por otra parte, a estos modelos no se incorporan mecanismos de bioadsorción que, cuando la concentración de biomasa es elevada, tienen importancia en la cinética del proceso (Shen et al., 2005; Ye y Li, 2007).

En este capítulo se presentan los resultados de la decoloración anaerobia de 246TCP en discontinuo empleando lodo granular anaerobio procedente de reactores EGSB, uno de los cuales había sido bioaumentado con *Desulfotobacterium chlororespirans*, *D. hafniense* TCP-A y *D. hafniense* PCP-1. Asimismo, se discute el efecto del compuesto sobre el metabolismo de los microorganismos presentes en el lodo, se propone un mecanismo cinético para explicar la inhibición detectada en la metanogénesis y se estudia la cinética de decoloración del compuesto teniendo en cuenta la bioadsorción del mismo en los gránulos.

8.2 Materiales y métodos

8.2.1 Reactores

Se utilizaron digestores anaerobios cilíndricos de 2,5 L de capacidad fabricados en metacrilato. Los reactores se operaron en discontinuo. Para homogeneizar el medio de reacción, los reactores se sometieron a agitación intermitente de 30 segundos cada 20 minutos utilizando agitadores magnéticos para evitar la disgregación del inóculo. Los digestores disponían de toma de muestras aislada del espacio de cabeza del reactor con el fin de impedir la entrada de oxígeno. El gas generado se burbujeó en una trampa de NaOH para retener el CO_2 , y el CH_4 resultante se midió con un gasómetro hidráulico. La temperatura de trabajo se fijó en 30 ± 1 °C. Las muestras se filtraron y se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis. En la Figura 8.1 se presenta una imagen de los reactores en un momento del experimento, y un esquema de su funcionamiento.

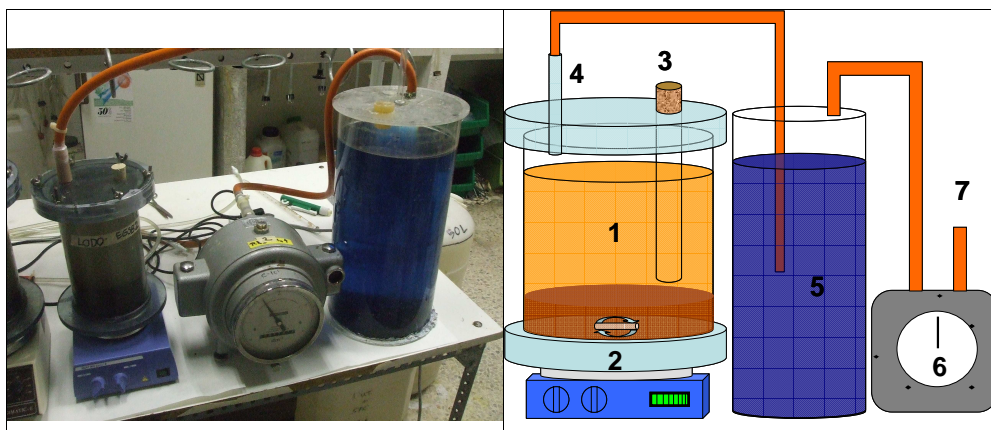


Figura 8.1: Montaje en laboratorio y esquema de los reactores anaerobios discontinuos empleados. (Clave: 1. Reactor anaerobio 2. Sistema de agitación periódica 3. Toma de muestras 4. Salida de gases 5. Trampa de NaOH 6. Gasómetro hidráulico 7. Purga de gases).

8.2.2 Fuente de biomasa

Se empleó lodo granular procedente de los reactores EGSB que se utilizaron para el tratamiento de 246TCP en continuo, cuyos resultados se describen en los Capítulos 6 y 7. El lodo se extrajo de los reactores cuando se estaban tratando concentraciones de 65 mg 246TCP L⁻¹. Uno de los reactores estaba bioaumentado con 3 cepas del género *Desulfitobacterium* (EGSB-Bio), mientras que el otro se utilizó como control (EGSB-C). Ambos lodos tenían un diámetro entre 1 y 2 mm, y sus SMA eran de 0,46 y 0,51 g CH₄-DQO g⁻¹ SSV d⁻¹ para los lodos de los reactores EGSB-C y EGSB-Bio, respectivamente.

8.2.3 Preparación del agua sintética

El 246TCP (Sigma-Aldrich) se disolvió hasta 10 g L⁻¹ en NaOH 0,2 M y se tomaron alícuotas de esta disolución para preparar el agua residual. La fuente de macro y micronutrientes se preparó como viene descrito en el Capítulo 2. El medio basal se suplementó con fuente de carbono consistente en sacarosa, etanol y extracto de levadura en proporción másica de DQO 3:2:0,1, hasta una concentración en torno a 7,5 g DQO L⁻¹. Asimismo, se suministró NaHCO₃ a razón de 1 g g⁻¹ DQO. Se añadió 1 mL L⁻¹ de una disolución 100 g L⁻¹ de Na₂S·10H₂O y se burbujeó el agua sintética con N₂:CO₂ 80:20 con objeto de eliminar el oxígeno disuelto.

8.2.4 Diseño del experimento

El experimento se dividió en cuatro ensayos en los que se añadieron concentraciones crecientes de 246TCP. En la Tabla 8.1 se muestra el diseño experimental. Entre cada ensayo, los reactores se sometieron a un periodo de recuperación de 4 días en los que no se suministró 246TCP. Antes de la adición del tóxico, el lodo se lavó con PBS para minimizar la cantidad de clorofenoles adsorbida sobre los gránulos.

Tabla 8.1: Diseño del experimento en discontinuo.

Ensayo	246TCP (mg L ⁻¹)	SSV EGSB-C (g)	SSV EGSB-Bio (g)	Duración (h)
1	50			53
2	75	23,73	22,73	77
3	100			55
4	150			71

8.2.5 Métodos analíticos

La DQO y los SSV se cuantificaron de acuerdo con el [APHA Standard Methods \(1992\)](#). El pH se midió por electrometría utilizando un pH-metro CRISOM GLP-21. El 246TCP y sus intermedios de reacción se cuantificaron mediante HPLC de igual forma que está descrito en el Capítulo 4. Los ácidos orgánicos y el etanol se cuantificaron mediante HPLC con detector de índice de refracción con el mismo método descrito en el Capítulo 3.

8.3 Resultados y Discusión

8.3.1 Influencia del 246TCP sobre los procesos fermentativos

La evolución de la DQO soluble, metano producido y pH se muestra en las Figuras 8.2 y 8.3, para cada uno de los dos reactores empleados. La Figura 8.2 recoge los ensayos con 50 y 75 mg 246TCP L⁻¹, y la Figura 8.3 con 100 y 150 mg 246TCP L⁻¹. La evolución de las tres variables es muy diferente dependiendo de la concentración de 246TCP empleada. Las eficiencias de eliminación de DQO en ambos reactores fueron muy similares para cada una de las concentraciones de 246TCP ensayadas, observándose una progresiva inhibición del proceso de digestión a partir de una concentración de 50 mg 246TCP L⁻¹, calculándose una EC₅₀ para el consumo de DQO de 76 mg 246TCP L⁻¹ en ambos casos.

La variación de la DQO sufrió una disminución mucho más pronunciada en la fase inicial que en la parte final del proceso, lo que parece indicar que el efecto inhibitorio del 246TCP sobre la degradación de DQO requiere de un periodo de tiempo para que el compuesto penetre a través de la pared celular y se adsorba en la membrana (Sikkema et al., 1995).

La inhibición detectada en la producción de metano es significativamente menor que en el caso de la degradación de DQO, ya que se obtuvieron valores de EC₅₀ para la metanogénesis de 108 y 92 mg 246TCP L⁻¹ para los reactores con lodo EGSB-C y EGSB-Bio, respectivamente. De igual manera que en el caso de la DQO, la producción de metano fue muy superior durante las primeras horas del proceso, aunque la diferencia en la producción de metano durante las primeras horas en función de la concentración de 246TCP fue bastante inferior a la diferencia de disminución de DQO.

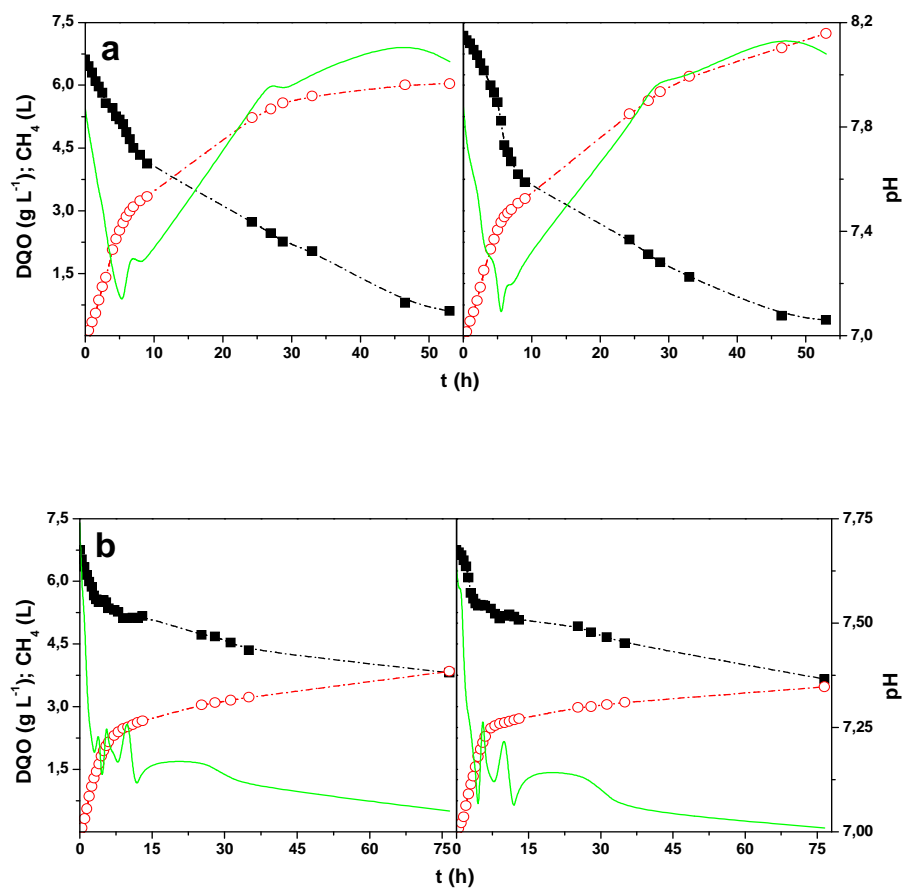


Figura 8.2: Evolución de la DQO (■), producción de metano (○) y pH (—) en los ensayos en discontinuo utilizando lodo proveniente del reactor EGSB-C (izda.) y del reactor EGSB-Bio (dcha.) para concentraciones de 246TCP de 50 (a) y 75 (b) mg L⁻¹.

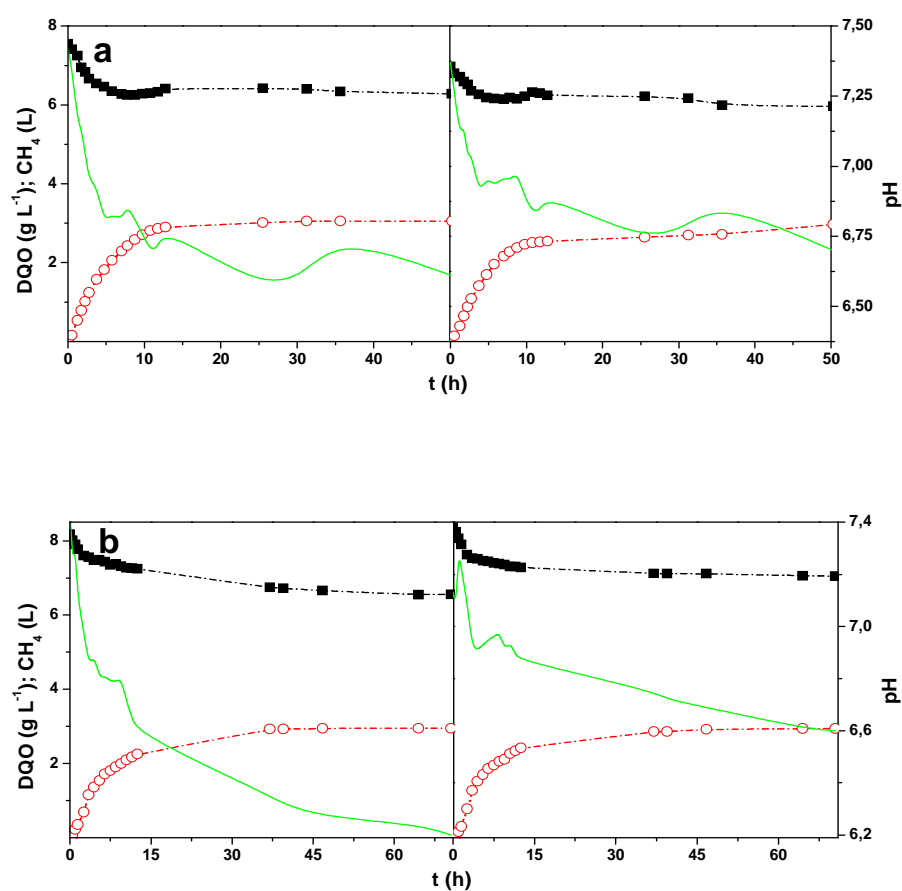


Figura 8.3: Evolución de la DQO (■), producción de metano (○) y pH (—) en los ensayos en discontinuo utilizando lodo proveniente del reactor EGSB-C (izda.) y del reactor EGSB-Bio (dcha.) para concentraciones de 246TCP de 100 (a) y 150 (b) mg L^{-1} .

Para estudiar en profundidad las diferencias encontradas en la degradación de DQO y la producción de metano, se realizó un seguimiento de los principales compuestos orgánicos procedentes de la degradación de la fuente de carbono empleada (sacarosa y etanol). En la Figura 8.4 se muestra la evolución de estos compuestos orgánicos para concentraciones de

246TCP de 50 y 75 mg L⁻¹, mientras que en la Figura 8.5 se recoge la misma información para 100 y 150 g 246TCP L⁻¹.

En el ensayo con 50 mg 246TCP L⁻¹, los compuestos intermediarios generados se consumieron durante el proceso hasta desaparecer al final del ensayo. Esto concuerda con la elevada eficiencia de DQO y producción de metano en ambos reactores. El origen de los intermedios de reacción detectados es la fermentación heteroláctica de la sacarosa, que genera etanol y lactato, la fermentación propiónica, que genera propionato, y la oxidación anaerobia de etanol a acetato. La oxidación de propionato puede generar acetato o etanol, en función de la vía metabólica, y la degradación del lactato genera acetato. El acetato es finalmente transformado en metano por acción de los metanógenos acetoclásticos. Entre estos pasos, existe una producción neta de hidrógeno en la oxidación de etanol, propionato y lactato. La metanogénesis del acetato no influye en la concentración de hidrógeno. El hidrógeno es finalmente transformado a metano por acción de los metanógenos hidrogenótrofos.

En los ensayos realizados con concentraciones superiores a 50 mg 246TCP L⁻¹ comienzan a apreciarse los efectos inhibitorios del 246TCP sobre la degradación de los intermedios orgánicos. De esta manera, a una concentración de 246TCP de 75 mg L⁻¹ se produjo una acumulación de acetato y propionato, mientras que la degradación de lactato y etanol no pareció verse afectada (Figura 8.4). Este hecho ha sido previamente observado por [Collins et al. \(2005\)](#), a 37 °C la EC₅₀ de 246TCP para la degradación de propionato y acetato alcanzó valores de 58,5 y 90 mg 246TCP L⁻¹, respectivamente. En el ensayo con una concentración de 100 mg 246TCP L⁻¹ se originó una mayor acumulación de acetato (Figura 8.5), con valores entre 3,5 y 4 g L⁻¹, frente a los valores inferiores a 3 g L⁻¹ acumulados para una concentración de 246TCP de 75 mg L⁻¹. Asimismo, la degradación del lactato se vio desplazada en el tiempo, y el etanol se acumuló tras una primera etapa de degradación, lo que indica que a esta concentración se produjo una inhibición en la oxidación anaerobia de etanol.

Finalmente, en el ensayo para una concentración de 246TCP de 150 mg L⁻¹ se observó la acumulación de todos los intermedios de reacción, incluido lactato. Asimismo, la cantidad acumulada de acetato fue superior a 4 g L⁻¹ en los dos reactores. Además, también se observó acumulación de etanol desde el inicio, indicio de que su digestión estuvo inhibida durante todo el proceso. El incremento en la concentración de etanol registrado en el reactor inoculado con lodo EGSB-Bio permite suponer que también se llevó a cabo la fermentación

ácido mixta de la glucosa, y que posteriormente la oxidación a acetato del etanol generado en esta fermentación estuvo inhibida.

La acumulación de intermedios de reacción explica en parte la reducción en el consumo de DQO detectada. Además, esta acumulación generó una disminución en el pH que resultó más acusada en función de la concentración de ácidos orgánicos generados (Figuras 8.2 y 8.3).

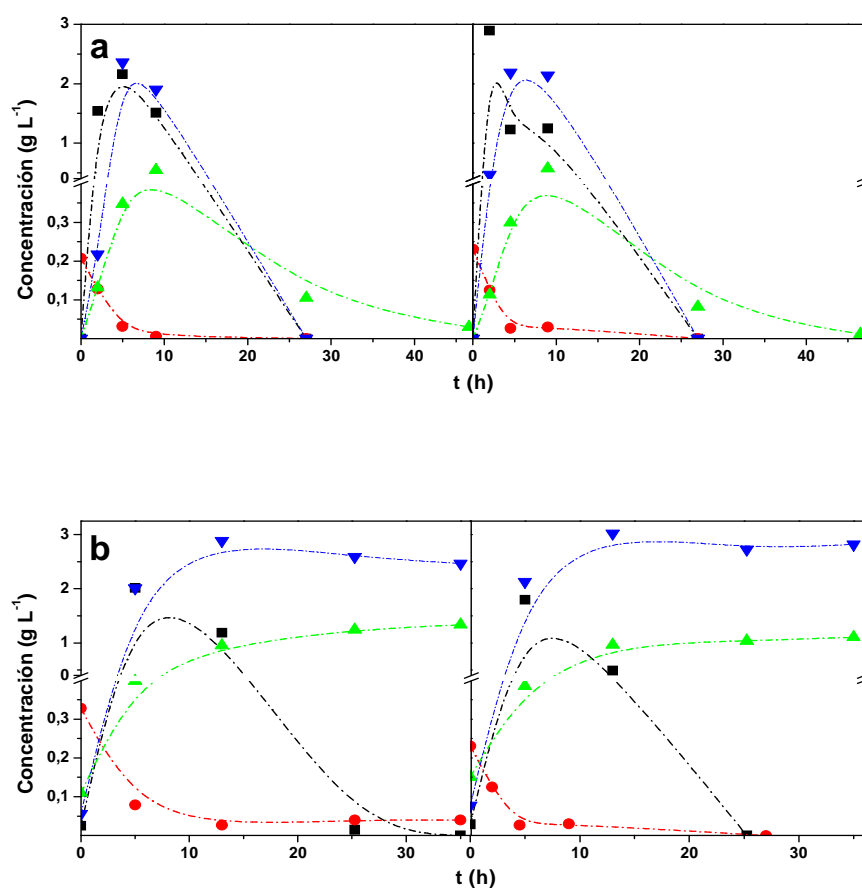


Figura 8.4: Evolución de los principales compuestos orgánicos detectados: lactato (■), acetato (▼), propionato (▲) y etanol (●), en los reactores inoculados con lodo EGSB-C (izda.) y EGSB-Bio (dcha.) para concentraciones de 246TCP de 50 (a) y 75 (b) mg L⁻¹.

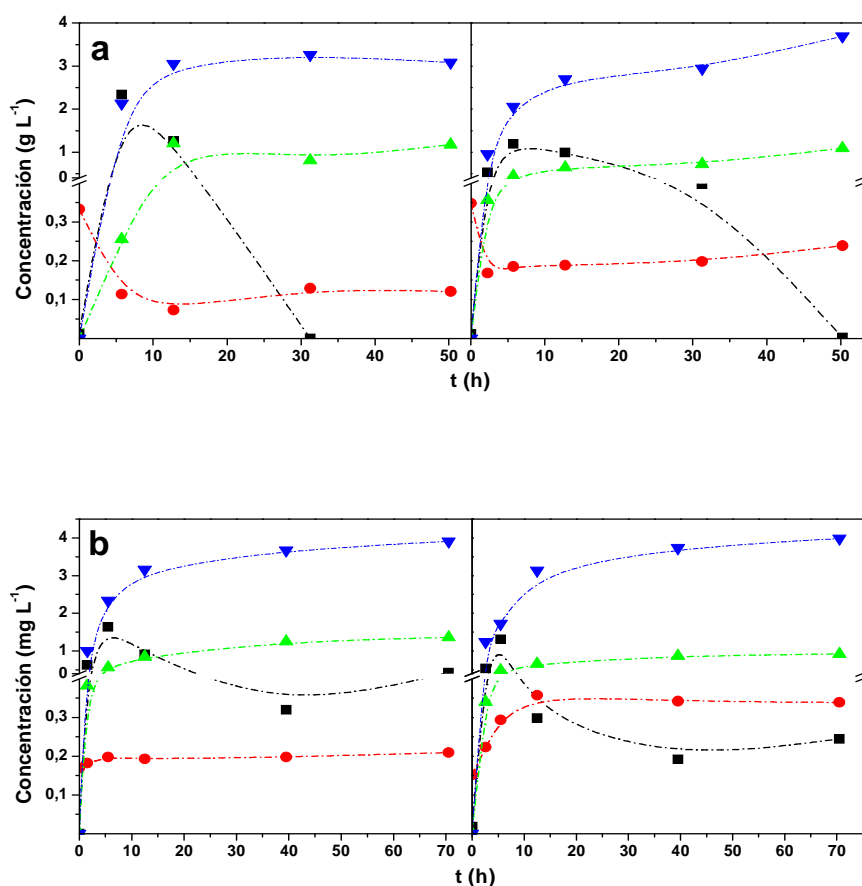


Figura 8.5: Evolución de los principales compuestos orgánicos detectados: lactato (■), acetato (▼), propionato (▲) y etanol (●), en los reactores inoculados con lodo EGSB-C (izda.) y EGSB-Bio (dcha.) para concentraciones de 246TCP de (a) 100 y (b) 150 mg L⁻¹.

Esta disminución de pH ha sido relacionada con la inhibición en la dechloración del 246TCP (Mun et al., 2008), ya que el consumo de acetato y la dechloración del 246TCP son procesos sintróficos (Perkins et al., 1994). En el ensayo con una concentración de 50 mg L⁻¹ los ácidos no se acumularon, por lo que el pH, que inicialmente sufrió una caída, posteriormente se estabilizó a medida que los ácidos se consumieron. En la Figura 8.6 se muestra un esquema de la ruta metabólica de degradación de los compuestos orgánicos.

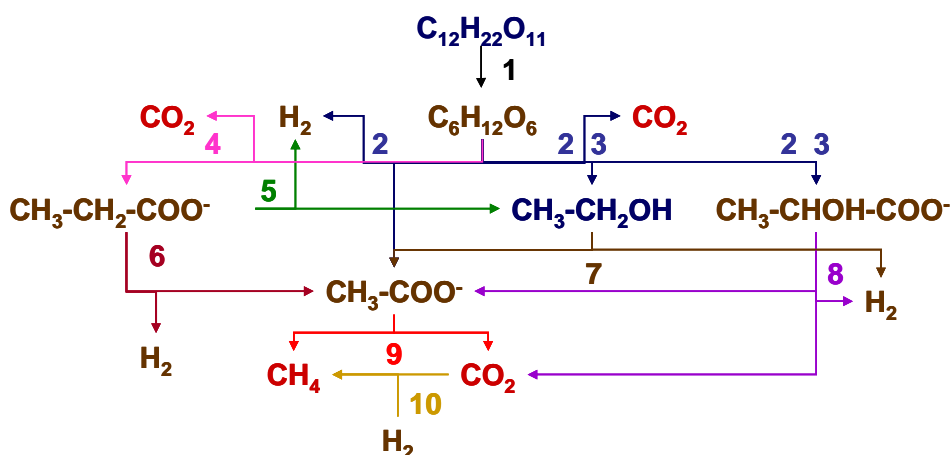


Figura 8.6: Etapas fermentativas propuestas en la degradación de la sacarosa y del etanol en los ensayos en discontinuo. (Azul): Productos iniciales. (Rojo): Productos finales. (Marrón): Productos intermedios. **1.** Hidrólisis de sacarosa. **2.** Fermentación ácido mixta **3.** Fermentación heteroláctica **4.** Fermentación propiónica **5.** Oxidación anaerobia de propionato a etanol **6.** Oxidación anaerobia de propionato a acetato **7.** Oxidación anaerobia de etanol **8.** Oxidación anaerobia de lactato **9.** Metanogénesis acetoclástica. **10.** Metanogénesis hidrogenotrófica.

Realizando un balance de DQO de los intermedios de fermentación, se obtuvo que, en los ensayos a partir de $75 \text{ mg } 246\text{TCP L}^{-1}$, la suma másica en DQO de acetato, propionato, etanol y lactato representó más del 95% de la DQO total al final de cada experimento, lo cual corrobora la validez de la ruta metabólica propuesta. Además, a partir de la décima hora de digestión, el acetato supuso entre el 55 y el 64% de la DQO total en estos ensayos. Esto indica que la metanogénesis acetoclástica estuvo inhibida para concentraciones de 246TCP superiores a 50 mg L^{-1} . Por otro lado, la cantidad de metano (expresada en DQO) generada durante estas primeras 10 h de digestión fue muy superior a la DQO consumida. La metanogénesis hidrogenotrófica no disminuye la DQO. Debido a ello, es de suponer que la disminución de DQO durante este tiempo se deba únicamente a la generación de CO_2 a partir de las diferentes etapas fermentativas. Por tanto, el metano generado para esas concentraciones puede atribuirse mayoritariamente a la metanogénesis hidrogenotrófica, lo cual implica que esta vía metanogénica apenas estuvo afectada por la presencia de 246TCP.

8.3.2 Cinética de la inhibición de la metanogénesis

En este apartado se plantea un modelo cinético que permita explicar el proceso de inhibición metanogénica detectado en el experimento. El planteamiento del modelo se basa en los siguientes supuestos:

1. La velocidad de producción de metano se describe mediante un modelo de pseudo-primer orden (Edeline, 1980), según la Ecuación 8.1.

$$\frac{dM}{dt} = k_M \cdot (M_{Max} - M) \quad [8.1]$$

donde M expresa la cantidad de metano producida en un periodo de tiempo determinado (L CH₄), k_M es la constante aparente de metanogénesis (h⁻¹), y M_{Max} expresa la máxima cantidad de metano producida para un tiempo de digestión infinito (L CH₄). En este modelo se considera constante la concentración de microorganismos, por lo que tanto la concentración inicial de biomasa (X_o) como el factor de rendimiento (Y_{XS}) se incluyen en k_M .

2. La producción de metano se puede explicar mediante los procesos de metanogénesis hidrogenotrófica y acetoclástica, que ocurren de forma simultánea pero a diferente velocidad (diauxia), lo que ha sido empleado en algunos trabajos de digestión anaerobia (Kim et al., 1996; Qu et al., 2009). Así, la expresión que explica el proceso de diauxia de la metanogénesis se puede describir mediante la Ecuación 8.2.

$$\frac{dM}{dt} = \frac{dM_A}{dt} + \frac{dM_B}{dt} \quad [8.2]$$

donde M_A y M_B representan las cantidades de metano producidas a partir de la metanogénesis acetotrófica e hidrogenotrófica, respectivamente (L CH₄). Combinando las expresiones 8.1 y 8.2 se puede obtener la Ecuación 8.3.

$$\frac{dM}{dt} = k_{M_A} \cdot (M_{Max_A} - M_A) + k_{M_B} \cdot (M_{Max_B} - M_B) \quad [8.3]$$

donde M_{MaxA} y M_{MaxB} representan las cantidades máxima de metano generado para un tiempo de digestión infinito y k_{MA} y k_{MB} son las constantes de producción de metano, para los procesos de metanogénesis acetoclástica e hidrogenotrófica, respectivamente. Los parámetros cinéticos se calcularon ajustando los resultados experimentales de los ensayos al modelo representado por la Ecuación 8.3, mediante regresión no lineal utilizando el software comercial Scientist 3.0. En la Tabla 8.2 se muestran los resultados de este ajuste.

Tabla 8.2: Valores de las constantes cinéticas resultantes del ajuste de los datos experimentales al modelo diáuxico de producción de metano.

Lodo	246TCP (mg L ⁻¹)	$k_{MA} \cdot 10^3$ (h ⁻¹)	k_{MB} (h ⁻¹)	M_{MaxA} (L CH ₄)	M_{MaxB} (L CH ₄)	R^2
<i>EGSB-C</i>	50	69,3	0,138	3,20	2,87	0,998
	75	5,3	0,218	3,41	2,65	0,999
	100	3,4	0,204	3,15	2,91	0,999
	150	0,5	0,129	3,21	2,85	0,999
<i>EGSB-Bio</i>	50	40,8	0,210	5,57	2,05	0,998
	75	1,8	0,188	3,09	2,97	0,994
	100	0,02	0,192	3,25	2,81	0,997
	150	0,5	0,151	3,23	2,83	0,998

Como puede verse en la Tabla 8.2, existe una variación de los parámetros cinéticos del modelo en función de la concentración de 246TCP, por lo que el modelo no permite predecir la producción de metano para cualquier concentración de 246TCP ensayada. En la Figura 8.7 se muestra la dependencia de los parámetros cinéticos calculados en función de la concentración de 246TCP, donde se aprecia que tanto la constante de velocidad de la metanogénesis hidrogenotrófica, k_{MA} (Figura 8.7a), como la relación existente entre los valores máximos de producción de metano a partir de la metanogénesis hidrogenotrófica y acetotrófica (Figura 8.7b) apenas están condicionados por la concentración de 246TCP, mientras que la constante de velocidad de la metanogénesis acetoclástica, k_{MB} (Figura 8.7a) parece seguir una tendencia exponencial decreciente con el aumento de la concentración de 246TCP. Esta tendencia parece indicar que se produce inhibición en la metanogénesis acetoclástica, lo que puede modelizarse introduciendo un término de inhibición acompetitiva

en el término correspondiente a la metanogénesis acetoclástica, que puede expresarse mediante la Ecuación 8.4.

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k_{M_A} \cdot (M_{Max_A} - M_A)}{1 + \left(\frac{I}{K_i}\right)^n} + k_{M_B} \cdot (M_{Max_B} - M_B) \quad [8.4]$$

donde K_i e I representan la constante de inhibición y la concentración de inhibidor, respectivamente, expresado en mg 246TCP L⁻¹, y n representa el orden de inhibición (adimensional). El uso de expresiones que predigan una inhibición no competitiva o acompetitiva se ha descrito mediante la multiplicación de la velocidad de producción de metano por $(1/(1+(I/K_i)^n))$. El exponente n determina el tipo de inhibición que sucede, de la siguiente forma (Fountoulakis et al., 2008):

- a) Cuando $n = 1$, la inhibición es del tipo no competitivo.
- b) Cuando $n < 1$, el efecto inhibitorio en la cinética no depende de la concentración de inhibidor.
- c) Cuando $n > 1$, la concentración de inhibidor influye determinadamente sobre la cinética.

Los resultados experimentales se ajustaron al modelo representado por la Ecuación 8.4 haciendo uso del Software Scientist 3.0. En la Tabla 8.3 se recogen los parámetros y la bondad del ajuste al modelo propuesto, mientras que en la Figura 8.8 se muestra el ajuste cinético del mismo. El modelo predice con precisión los valores de producción de metano.

Por otro lado, el valor de k_{M_A} obtenido en ambos reactores indica que el reactor provisto de lodo bioaumentado realiza la metanogénesis acetotrófica con mayor rapidez que el reactor control (0,367 frente a 0,286 h⁻¹). Además, la capacidad metanogénica acetotrófica también fue superior (M_{Max_A} igual a 5,31 frente a 3,11 L CH₄), mientras que no se encontraron diferencias respecto a la metanogénesis hidrogenotrófica, ni en el valor de la constante de velocidad (0,176 frente a 0,166 h⁻¹) ni en la cantidad máxima de metano generada (2,87 frente a 2,95 L CH₄). Las constantes de inhibición calculadas tomaron valores próximos (41,4 y 35 mg L⁻¹ para los lodos EGSB-C y EGSB-Bio, respectivamente). Esto, unido a la similitud en los órdenes de inhibición (7,1 y 6,9), parece indicar que el 246TCP ejerce una acción

inhibitoria sobre la metanogénesis acetotrófica muy parecida sobre ambos lodos. El supuesto de no tener en cuenta efectos inhibitorios sobre la metanogénesis hidrogenotrófica está en connivencia con los resultados de Kim et al. (1996), que determinaron que la presencia de 3CP no alteró la cinética de la metanogénesis hidrogenotrófica.

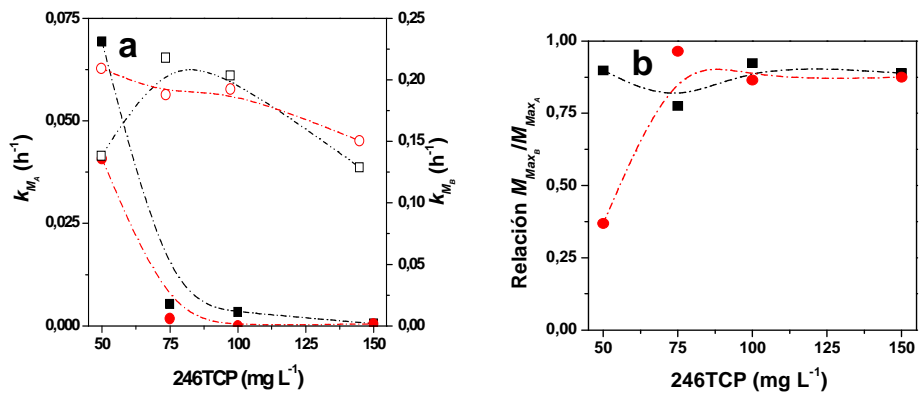


Figura 8.7: (a) Valor de las constantes k_{M_A} y k_{M_B} en los ensayos con lodo EGSB-C (■,□) y lodo EGSB-Bio (●,○), respectivamente y (b) Evolución de la relación entre M_{Max_B} y M_{Max_A} en los ensayos con lodo EGSB-C (■) y lodo EGSB-Bio (●), respectivamente, en función de la concentración de 246TCP.

Tabla 8.3: Valores de los parámetros cinéticos obtenidos en el ajuste de los resultados experimentales a la Ecuación 8.4.

Lodo	246TCP (mg L ⁻¹)	k_{M_A} (h ⁻¹)	k_{M_B} (h ⁻¹)	M_{Max_A} (L CH ₄)	M_{Max_B} (L CH ₄)	K_i (mg L ⁻¹)	n	R^2	R^2 global
EGSB-C	50	0,286	0,166	3,11	2,95	41,4	7,1	0,997	0,994
	75							0,997	
	100							0,992	
	150							0,986	
EGSB-Bio	50	0,367	0,176	5,31	2,87	35,0	6,9	0,998	0,996
	75							0,992	
	100							0,995	
	150							0,993	

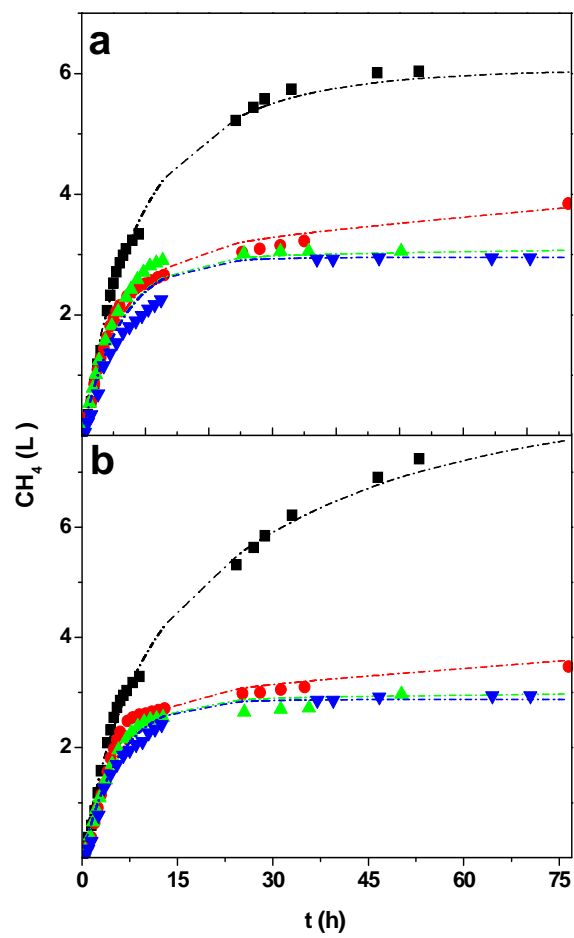


Figura 8.8: Evolución de la producción de CH_4 en los reactores con lodo EGSB-C (a) y EGSB-Bio (b) para concentraciones de 246TCP de 50 (■), 75 (●), 100 (▲) y 150 (▼) y predicción calculada por el modelo representado en la Ecuación 8.4 (líneas discontinuas).

8.3.3 Biodegradación y decoloración de 246TCP

En las Figuras 8.9 y 8.10 se recoge la evolución del 246TCP y sus intermedios de reacción en los reactores discontinuos para concentraciones de 50, 75 (Figura 8.9), 100 y 150 mg 246TCP L⁻¹ (Figura 8.10). Se observa la aparición en todos los ensayos de intermedios de reacción propios de *orto*-decoloración de 246TCP, esto es, 24DCP y 4CP, aunque a diferentes concentraciones finales en función de la concentración inicial de 246TCP empleada. No se detectaron intermedios de la *para*-decoloración (2CP o 26DCP). Se conoce que *D. hafniense*, que como se vio en el Capítulo 7 estaba presente en el lodo de ambos reactores EGSB, es capaz de realizar *para*-decoloración (Beaudet et al., 1996; Villemur et al., 2006). Una explicación posible es que la velocidad de degradación de los intermedios derivados de esta estrategia de decoloración fue más rápida que la velocidad de generación, por lo que no se acumularon.

Además, en todos los casos se acumuló el 4CP generado, no siendo relevante su degradación en el intervalo de tiempo de estudio, por lo que se le puede considerar como producto final. La limitación en los procesos de decoloración anaerobia de clorofenoles debida a la formación de productos finales no degradables se explica por la falta de aclimatación del lodo a la decoloración en una posición determinada o de un compuesto concreto (Mohn y Kennedy, 1992). Esta falta de aclimatación favorece una vía de decoloración (en este caso, la vía *orto*), e incluso impide la decoloración de algunos compuestos.

Este hecho ha sido observado por Mun et al. (2008), los cuales utilizaron un lodo acidogénico adaptado a decolorar 246TCP en la decoloración anaerobia de PCP. Así, observaron que el PCP se decoloró en posición *orto* (realizando la actividad a la que el lodo había sido previamente adaptado, esto es, la *orto*-decoloración del 246TCP) generando como producto final 345TCP.

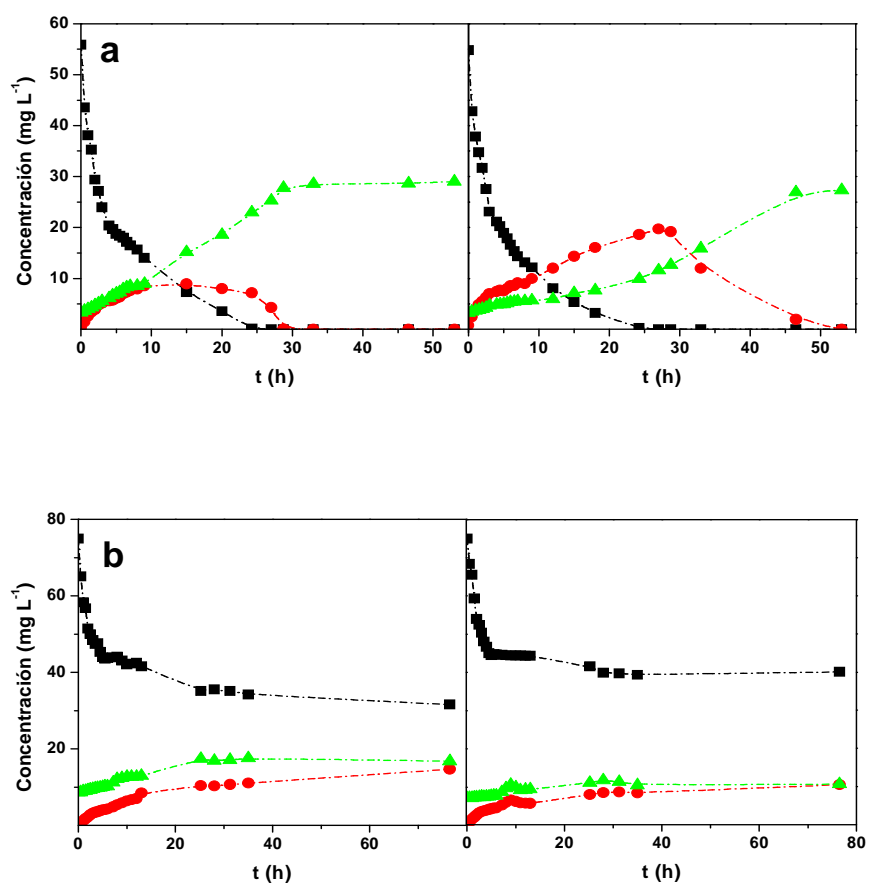


Figura 8.9: Evolución de la concentración de 246TCP (■), 24DCP (●) y 4CP (▲), en los ensayos en discontinuo para concentraciones iniciales de 246TCP de 50 (a) y 75 (b) mg L⁻¹ utilizando reactores con lodos EGSB-C (izda.) y EGSB-Bio (dcha.).

En el caso contrario, la adaptación de un lodo a la dechloración de PCP permite que el lodo sea capaz de dechlorar otros clorofenoles por diferentes vías, llegando incluso a dechlorar 4CP. Así, [Kennes et al. \(1996\)](#) observaron que un lodo adaptado a PCP puede dechlorar y mineralizar completamente tanto 246TCP y 345TCP como 4CP y 2CP, es decir, permite la dechloración en posiciones *orto*, *meta* y *para*. De esta manera, la hipótesis establecida por

Takeuchi et al. (2000), que sostiene que la ruta metabólica preferencial de dechloración de clorofenoles se debe a la posición del grupo cloruro, y por tanto a su diferente potencial redox derivado de impedimentos estéricos, no se cumple empleando lodos adaptados.

Por otra parte, la eficiencia de degradación del 246TCP disminuyó notablemente en función de la concentración inicial, siendo del 100% en ambos reactores en los ensayos a 50 mg 246TCP L⁻¹, disminuyendo hasta el 31,5% y 21% en el caso de emplear 150 mg L⁻¹, para los reactores con lodo EGSB-C y EGSB-Bio, respectivamente. Por otro lado, se observan dos pendientes en la evolución de 246TCP. La primera, de pendiente elevada, se detecta durante las primeras 5 h del proceso, probablemente debido a la adsorción de 246TCP en los gránulos anaerobios; y una segunda pendiente de menor magnitud debida al proceso de eliminación biológica. Además, en los ensayos con 100 y 150 mg 246TCP L⁻¹ se alcanzaron porcentajes de eliminación de 246TCP muy similares durante las primeras 10 h del proceso, no existiendo apenas actividad dechloradora debido a la escasa aparición de intermedios de degradación. Esto refuerza la hipótesis de que la eliminación de 246TCP se produjo tanto por vía biótica como por vía abiótica. Este apunte se refuerza por el hecho de que el equilibrio de adsorción de clorofenoles sobre lodo granular anaerobio ha sido establecido en otros trabajos en menos de 1 d (Tsezos et al., 1989). El aumento de 246TCP detectado a partir de las 15 h de digestión en los ensayos a 100 y 150 mg 246TCP L⁻¹ puede deberse a procesos de desorción parcial del 246TCP, como ya ha sido observado con anterioridad en otros clorofenoles (Shen et al., 2005; Ye y Li, 2007).

8.3.4 Modelo cinético de la dechloración anaerobia de 246TCP

En esta apartado se realiza una aproximación cinética del proceso de eliminación de 246TCP. Para ello se utilizaron los resultados del ensayo para concentración de 246TCP de 50 mg L⁻¹, debido a que fue el único en el que se logró eliminar completamente el 246TCP. Para el estudio cinético se tuvieron en cuenta los siguientes supuestos:

1. La desaparición del 246TCP se atribuye a dos procesos diferenciados. Por un lado, el 246TCP es adsorbido en los gránulos. Este proceso puede explicarse mediante un modelo cinético de pseudo-segundo orden. Por otro lado, el 246TCP es dechlorado en posición *orto* por acción de los microorganismos hasta 24DCP. Este proceso puede

explicarse mediante el modelo de Monod. Se simplificó el modelo asumiendo que el crecimiento de los microorganismos durante el tiempo del experimento debido a este proceso es despreciable, por lo que la cantidad de biomasa se considera constante. La asunción de modelos cinéticos derivados de la ecuación de Michaelis-Menten despreciando crecimiento biológico en la decloración anaerobia de clorofenoles es muy habitual (Armenante et al., 1999).

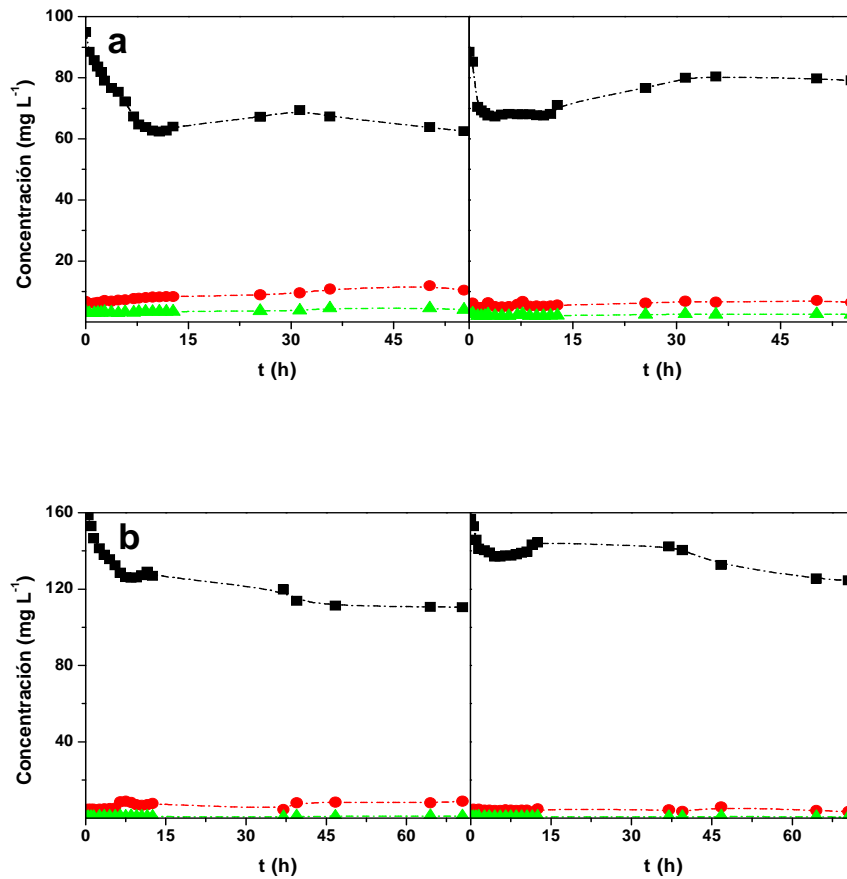
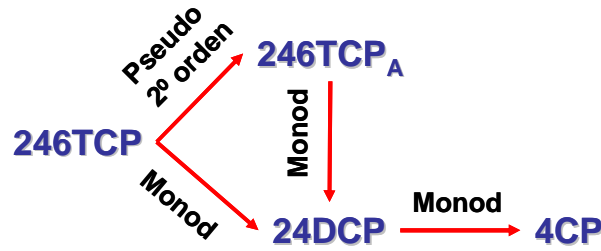


Figura 8.10: Evolución de la concentración de 246TCP (■), 24DCP (●) y 4CP (▲), en los ensayos en discontinuo para concentraciones iniciales de 246TCP de 100 (a) y 150 (b) mg L⁻¹ utilizando reactores con lodos EGSB-C (izda.) y EGSB-Bio (dcha.).

2. El 246TCP adsorbido sobre la superficie de los gránulos es también biodegradado hasta 24DCP siguiendo el modelo de Monod anteriormente mencionado. Para ello, es necesario que la adsorción sea reversible. Se conoce que la adsorción de clorofenoles sobre lodo granular anaerobio es reversible, siempre que la biomasa sea activa (Shen et al., 2005; Ye y Li, 2007).
3. El 24DCP se biodegrada en posición *orto* a 4CP pudiéndose explicar este paso igualmente mediante el modelo de Monod. El 4CP resultante se acumula en el medio como producto final.

Estos supuestos generan un mecanismo de reacción que se resume en el siguiente esquema:



donde 246TCP_A representa la cantidad de 246TCP que se adsorbe sobre la superficie de los gránulos. Este mecanismo se desarrolla en las Ecuaciones 8.5 a 8.8.

$$\frac{d246TCP}{dt} = -\frac{V_{\max,246TCP} \cdot 246TCP}{K_{s,246TCP} + 246TCP} - k_a \cdot (246TCP - 246TCP_E)^2 \quad [8.5]$$

$$\frac{d246TCP_A}{dt} = -\frac{V_{\max,246TCP} \cdot 246TCP_A}{K_{s,246TCP} + 246TCP_A} + k_a \cdot (246TCP - 246TCP_E)^2 \quad [8.6]$$

$$\frac{d24DCP}{dt} = \frac{V_{\max,246TCP} \cdot 246TCP}{K_{s,246TCP} + 246TCP} + \frac{V_{\max,246TCP} \cdot 246TCP_A}{K_{s,246TCP} + 246TCP_A} - \frac{V_{\max,24DCP} \cdot 24DCP}{K_{s,24DCP} + 24DCP} \quad [8.7]$$

$$\frac{d4CP}{dt} = \frac{V_{\max,24DCP} \cdot 24DCP}{K_{s,24DCP} + 24DCP} \quad [8.8]$$

en las cuales $246TCP$ y $246TCP_A$ representan la concentración molar de 246TCP en el medio líquido y la equivalente en el medio líquido sobre los biogránulos, respectivamente, $246TCP_E$ representa la concentración de 246TCP en el equilibrio tras la adsorción (μM), k_a es la constante aparente de adsorción equivalente (h^{-1}), $24DCP$ y $4CP$ las concentraciones de 24DCP y 4CP, respectivamente (μM), $V_{max,246TCP}$ y $V_{max,24DCP}$ las velocidades máximas de biodegradación de 246TCP y 24DCP, respectivamente ($\mu M h^{-1}$) y $K_{s,246TCP}$ y $K_{s,24DCP}$ representan las constantes de saturación para el 246TCP y el 24DCP, respectivamente (μM). Para calcular los parámetros del ajuste cinético se hizo uso del método matemático mencionado en el ajuste del modelo de inhibición metanogénica, simulando $246TCP_A$. Los resultados del ajuste se presentan en la Figura 8.11. Las constantes calculadas del modelo y la bondad de ajuste se muestran en la Tabla 8.4.

El modelo predice adecuadamente la evolución de las concentraciones de 246TCP, 24DCP y 4CP en los EGSB-C y EGSB-Bio. La velocidad de degradación del 246TCP resultó similar en ambos reactores, debido a la similitud en los valores de las constantes de saturación y velocidades máximas. No obstante, la velocidad específica máxima de degradación del 24DCP fue superior con el lodo EGSB-C (11,9 frente a $4,8 \mu M h^{-1}$), lo que se corresponde con la diferencia de la evolución real del 24DCP entre ambos reactores.

El elevado error en las constantes de saturación puede deberse a la asunción de un modelo de Monod, cuando en este caso probablemente exista algún grado de inhibición acompetitiva (inhibición por sustrato) que modifica estos valores en función de la concentración de cada compuesto. En cualquier caso, debido a que las concentraciones de trabajo están lejos de ser inhibitorias ($50 \text{ mg } 246TCP L^{-1}$), se asumió que la incidencia de esta inhibición no fue relevante en el proceso.

Los parámetros estimados para la degradación de 246TCP y 24DCP difieren respecto a otros estudios. Magar et al. (1999) ajustaron la concentración de varios clorofenoles, entre ellos el 24DCP y el 246TCP, utilizando la ecuación de Michaelis-Menten, similar al modelo de Monod. Las constantes de saturación y las velocidades máximas de ambos compuestos fueron $0,30$ y $0,11 \mu M$ y $6,0$ y $6,4 \mu M h^{-1}$ respectivamente, si bien las concentraciones de los ensayos a las que se estimaron fueron muy inferiores a las del presente trabajo (en torno a $10 \mu M$), por lo que se cometió el error de trabajar en condiciones en las que la cinética pudo asemejarse a un primer orden (donde $K_s \gg S$, por lo que en el

denominador de Monod, S es despreciable). Sponza y Uluköy (2008) calcularon los parámetros cinéticos de un reactor UASB tratando 24DCP. La constante de saturación obtenida fue de 12,4 μM , ligeramente inferior a la obtenida en el presente trabajo, empleando concentraciones iniciales similares.

En un ensayo similar al presente se estimaron los parámetros de Monod para la degradación de 246TCP, resultando en unos valores para $K_{s,246TCP}$, $V_{max,246TCP}$, $K_{s,24DCP}$ y $V_{max,24DCP}$ de 3,2 $\mu\text{M h}^{-1}$, 6,6 μM , 1,6 $\mu\text{M h}^{-1}$ y 1,9 μM , respectivamente (Armenante et al., 1999). La diferencia en las constantes de saturación se debió a que en el citado estudio no se tuvieron en cuenta procesos de adsorción, a pesar de trabajar con concentraciones de SSV similares a las del presente trabajo. La relevancia de la adsorción en la degradación de clorofenoles, sobre todo cuando las cargas másicas de microorganismos son relevantes, ha sido puesta de manifiesto por Shen et al. (2005) y por Ye y Li (2007), empleando en ambos casos PCP. Respecto a los parámetros estimados para la adsorción del 246TCP sobre los gránulos, se obtuvo un valor de la constante de velocidad muy similar con ambos reactores, y la concentración de 246TCP en el equilibrio obtenida (TCP_E) indica que la adsorción del 246TCP sobre los gránulos no dependió del tipo de lodo utilizado.

Tabla 8.4: Parámetros y bondad de ajuste calculados para el modelo de biodegradación anaerobia de 246TCP propuesto.

Lodo	k_a (h^{-1})	$K_{s,246TCP}$ (μM)	$K_{s,24DCP}$ (μM)	$V_{max,246TCP}$ ($\mu\text{M h}^{-1}$)	$V_{max,24DCP}$ ($\mu\text{M h}^{-1}$)	TCP_E (μM)	R^2
EGSB-C	$0,00232 \pm 0,00005$	$5,8 \pm 2,8$	$31,3 \pm 14,1$	$5,3 \pm 0,2$	$11,9 \pm 2,3$	$45,2 \pm 1,3$	0,996
EGSB-Bio	$0,00236 \pm 0,00009$	$13,1 \pm 4,5$	$26,9 \pm 21,9$	$5,1 \pm 0,3$	$4,8 \pm 1,1$	$41,9 \pm 2,0$	0,987

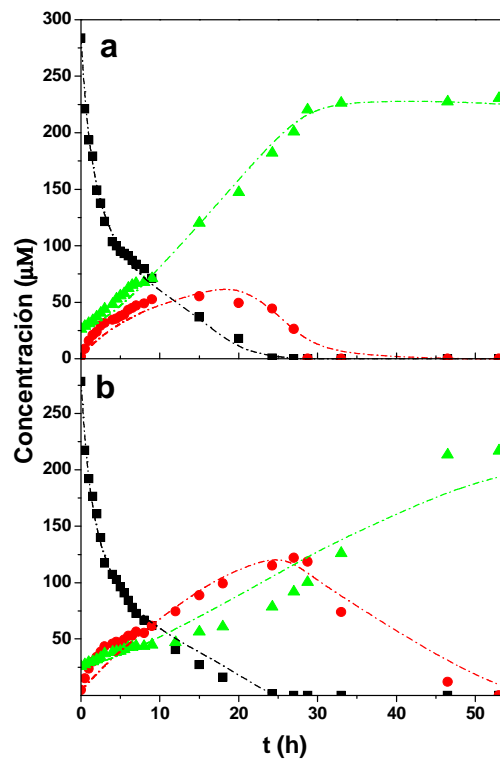
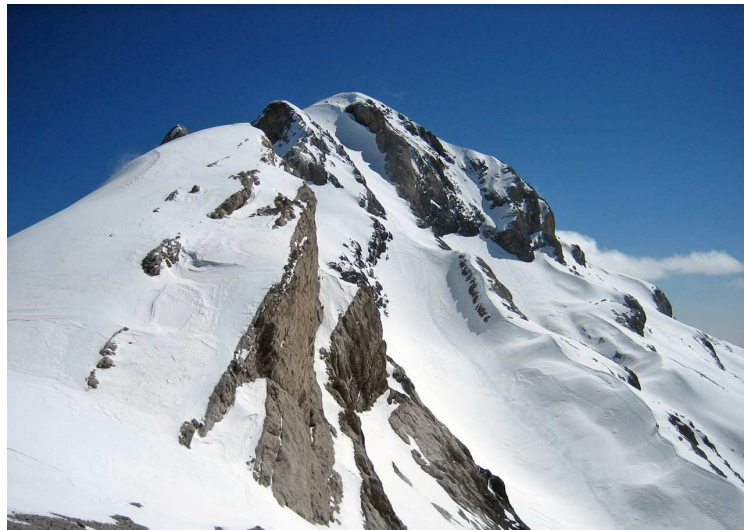


Figura 8.11: Ajuste de los datos experimentales de concentración de 246TCP (■), 24DCP (●) y 4CP (▲) al modelo propuesto en los reactores con lodo EGSB-C (a) y EGSB-Bio (b).

CONCLUSIONES



Monte Perdido. Pirineos. Huesca.

*La ciencia se construye a partir de aproximaciones que
gradualmente se acercan a la verdad.*

I. Asimov

Los resultados obtenidos, recogidos en la presente Memoria, han permitido establecer las siguientes conclusiones:

1. La degradación anaerobia de clorofenoles precisa de cosustratos que suministren equivalentes rédox. Así, la glucosa es un cosustrato adecuado para la decloración de 24DCP debido a la generación de hidrógeno durante su fermentación. Por otro lado, una combinación de etanol, sacarosa y extracto de levadura optimiza la decloración de 246TCP y la metanogénesis.
2. Los clorofenoles se degradan preferentemente mediante *orto*-decloración. Algunos intermediarios pueden degradarse mediante *para*-decloración, aunque el 4CP es recalcitrante y para lograr su decloración se necesitan periodos de adaptación muy largos.
3. Las tecnologías anaerobias de alta eficiencia suponen una alternativa viable para la eliminación de clorofenoles de aguas residuales. Los reactores UASB permiten tratar hasta 60 mg 24DCP L⁻¹ d⁻¹ con eficiencias superiores al 80%. Los reactores EGSB, por su parte, mejoran esta eficiencia y permiten tratar hasta 105 mg 24DCP L⁻¹ d⁻¹ y 250 mg 246TCP L⁻¹ d⁻¹ sin que la producción de metano se vea seriamente dañada. El empleo de reactores FBBR con carbón activo permiten alcanzar eficiencias de decloración elevadas y soportan condiciones de toxicidad extremas.
4. Los clorofenoles provocan inhibición en la actividad de la biomasa anaerobia, reduciendo la eficiencia de eliminación de la materia orgánica y de la metanogénesis, siendo ésta la etapa más afectada del proceso.
5. La eficiencia de decloración de 24DCP se puede optimizar ajustando la velocidad de carga orgánica empleando reactores UASB y EGSB, resultando en un incremento de *para*-decloración de 4CP. La biomasa metanogénica del reactor EGSB resulta más tolerante a este compuesto que la biomasa del UASB debido a la recirculación externa, que disminuye la concentración de 24DCP a la que están expuestos los microorganismos.
6. La inhibición de la actividad anaerobia por 24DCP afecta a la fermentación heteroláctica y ácido-mixta de la glucosa, a la oxidación anaerobia de lactato y a la metanogénesis hidrogenotrófica. La biodegradación anaerobia de 24DCP empleando glucosa

como cosustrato se ajusta adecuadamente al modelo de Hill. La inhibición tanto de la fermentación de glucosa como de la metanogénesis hidrogenotrófica se ajusta a un modelo inhibitorio no competitivo.

7. El empleo de diferentes cosustratos en la degradación anaerobia de 246TCP modifica su ruta de dechloración. Así, se promueve la ruta *orto* al utilizar etanol, metanol, lactato, ácidos grasos volátiles o formiato, y la ruta *para* empleando sacarosa, extracto de levadura o metilamina. La mayor velocidad de degradación de 246TCP se alcanza empleando etanol o metanol. La inhibición de la metanogénesis por 246TCP al emplear metilamina, ácidos grasos volátiles, lactato o formiato es más elevada que utilizando etanol, metanol o sacarosa.

8. El 246TCP ejerce un tipo de inhibición acompetitivo sobre la metanogénesis acetoclástica y la degradación de la materia orgánica de un lodo no adaptado. Estos efectos inhibitorios son proporcionales entre sí, lo cual implica que el 246TCP es un inhibidor no selectivo. La degradación de 246TCP se ajusta adecuadamente al modelo de Haldane.

9. La bioaumentación de reactores EGSB con cepas pertenecientes al género *Desulfitobacterium* mejora la producción de metano y ligeramente la eficiencia de dechloración de 246TCP. La aclimatación progresiva de la biomasa anaerobia a la degradación de 246TCP facilita el crecimiento de las arqueas metanogénicas en reactores FBBR bioaumentados. La bioaumentación mejora la estabilidad de los sistemas anaerobios sometidos a cambios bruscos en la velocidad de carga de 246TCP, teniendo la especie *D. chlororespirans* una relación directa con esta mejoría, resultado de una mayor velocidad de crecimiento que la especie *D. hafniense*.

10. Los procesos anaerobios más afectados por el 246TCP empleando lodo granular adaptado y bioaumentado con *Desulfitobacterium* spp. son la metanogénesis acetoclástica y la oxidación anaerobia de propionato. También se ven afectadas, en menor medida, la oxidación anaerobia de etanol y lactato. El 246TCP ejerce una inhibición acompetitiva sobre la metanogénesis acetoclástica, mientras que la hidrogenotrófica apenas se ve afectada. La biodegradación de 246TCP y de 24DCP se ajusta con precisión a un modelo de Monod con un componente de adsorción de pseudo-segundo orden.

BIBLIOGRAFÍA



Pico de Los Claveles. Macizo de Peñalara. Madrid.

*La revolución no se lleva en la boca para vivir de ella, se
lleva en el corazón para morir por ella.*

E. “Che” Guevara

Artículos

- Aangelidaki I., Ahrin B. K., Deng H. y Schmidt J. E. (2002).** Anaerobic digestion of olive oil mill effluents together with swine manure in UASB reactors. *Water Science and Technology* 45(10):213-218.
- Abecassis-Wolfovich M., Landau M. V., Brenner A. y Herskowitz M. (2007).** Low-temperature combustion of 2,4,6-trichlorophenol in catalytic wet oxidation with nanocasted Mn-Ce-oxide catalyst. *Journal of Catalysis* 247:201-213.
- Ahmaruzzaman Md. (2008).** Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 143:48-67.
- Ahn Y. H., Min K. S. y Speece R. E. (2001).** Full scale UASB reactor performance in the brewery industry. *Environmental Technology* 22:463-476.
- Aktas O. y Cecen F. (2007).** Adsorption, desorption and bioregeneration in the treatment of 2-chlorophenol with activated carbon. *Journal of Hazardous Materials* 141:769-777.
- Al Momani F., Sans C., Contreras S. y Esplugas S. (2006).** Degradation of 2,4-dichlorophenol by combining photo-assisted Fenton reaction and biological treatment. *Water Environment Research* 78(6):590-597.
- Al-Momani F., Touraud E., Degorce-Dumas J. R., Roussy J. y Thomas O. (2002).** Biodegradability enhancement of textile dyes and textile wastewater by VUV photolysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 153:191-197.
- Alphenaar P. A., Groeneveld N. y Van Aelst A. C. (1994).** Scanning electron microscopical method for internal structure analysis of anaerobic granular sludge. *Micron* 25:129-133.
- Amann R. I. (1995).** In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbiology Ecology Manual* 3.3.6:1-15.
- Amann R. I., Krumholz I. y Stahl D. A. (1990a).** Fluorescent - oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172:762-770.
- Amann R. I., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Devereux R. y Stahl D. A. (1990b).** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow

- cytometry for analyzing mixed microbial population. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1919-1925.
- Amann R. I., Ludwig W. y Schleifer, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 143-169.
- Amorim A. K. B., Zaiat M. y Foresti E. (2005).** Performance and stability of an anaerobic fixed bed reactor subjected to progressive increasing concentrations of influent organic matter and organic shock loads. *Journal of Environmental Management* 76:319-325.
- Andreozzi R., Cesaro R., Marotta R. y Pirozzi F. (2006).** Evaluation of biodegradation kinetic constants for aromatic compounds by means of aerobic batch experiments. *Chemosphere* 62:1431-1436.
- Andrews J. F. (1969).** Dynamic model of anaerobic digestion process. *Journal of the Sanitary Engineering Division. American Society of Civil Engineerings* 95-116.
- Annachhatre A. P. y Gheewala S. H. (1996).** Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnology Advances* 14:35-56.
- Antizar-Ladislao B. y Galil N.I. (2006).** Biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol and associated hydraulic conductivity reduction in sand-bed columns. *Chemosphere* 64:339-349.
- Aoyama H., Hojo H., Takahashi K. L., Shimizu N., Araki M., Harigae M., Tanaka N., Shirasaka N., Kuwahara M., Nakashima N., Yamamoto E., Saka M. y Teramoto S. (2005).** A two-generation reproductive toxicity study of 2,4-dichlorophenol in rats. *The Journal of Toxicological Sciences* 30:59-78.
- Armenante P. M., Kafkewitz D., Lewandowski G. A. y Jou C. J. (1999).** Anaerobic-aerobic treatment of halogenated phenolic compounds. *Water Research* 33:681-692.
- Atuanya E. I. y Chakrabarti T. (2003).** Biotreatability and kinetics of UASB reactor to mixtures of chlorophenol pollutants. *Environmental Monitoring and Assessment* 83:283-294.
- Atuanya E.I., Purohit H.J. y Chakrabarti T. (2000).** Anaerobic and aerobic biodegradation of chlorophenols using UASB and ASG bioreactors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16:95-98.

- Azbar N., Tutuk F. y Keskin T. (2009).** Biodegradation performance of an anaerobic hybrid reactor treating olive mill effluent under various organic loading rates. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63:690-698.
- Backhaus W. K., Klumpp E., Narres H. -D. y Schwuger M. J. (2001).** Adsorption of 2,4-dichlorophenol on Montmorillonite and Silica: Influence of nonionic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* 242:6-13.
- Baczynski T. P., Grotenhuis T. y Knipscheer P. (2004).** The dechlorination of cyclodiene pesticides by methanogenic granular sludge. *Chemosphere* 55:653-659.
- Bae H. S., Yamagishi T. y Suwa Y. (2002).** Evidence for degradation of 2-chlorophenol by enrichment cultures under denitrifying conditions. *Microbiology* 148:221-227.
- Bajaj M., Gallert C. y Winter J. (2008).** Anaerobic biodegradation of high strength 2-chlorophenol-containing synthetic wastewater in a fixed bed reactor. *Chemosphere* 73:705-710.
- Balfanz J. y Rehm H. J. (1991).** Biodegradation of 4-chlorophenol by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp. A 7-2 in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35:662-668.
- Bali U. y Sengul F. (2003).** The fate and effect of 4-chlorophenol in an upflow anaerobic fixed-bed reactor. *Process Biochemistry* 38:1201-1208.
- Ballesteros Martin M. M., Sanchez Perez J. A., Acien Fernandez F. G., Casas Lopez J. L., Garcia-Ripoll A. M., Arques A., Oller I. y Malato Rodriguez S. (2008a).** Combined photo-Fenton and biological oxidation for pesticide degradation: Effect of photo-treated intermediates on... *Chemosphere* 70:1476-1483.
- Ballesteros Martin M. M., Sanchez Perez J. A., Garcia Sanchez J. L., Montes de Oca L., Casas Lopez J. L., Oller I. y Malato Rodriguez S. (2008b).** Degradation of alachlor and pyrimethanil by combined photo-Fenton and biological oxidation. *Journal of Hazardous Materials* 155:342-349.
- Ballesteros Martin M. M., Sanchez Perez J. A., Casas Lopez J. L., Oller I. y Malato Rodriguez S. (2009a).** Degradation of a four-pesticide mixture by combined photo-Fenton and biological oxidation. *Water Research* 43:653-660.
- Ballesteros Martin M. M., Sanchez Perez J. A., Garcia Sanchez J. L., Casas Lopez J. L. y Malato Rodriguez S. (2009b).** Effect of pesticide concentration on the degradation

- process by combined solar photo-Fenton and biological treatment. *Water Research* 43:3838-3848.
- Baloch M. I., Akunna J. C., Kierans M. y Collier P. J. (2008).** Structural analysis of anaerobic granules in a phase separated reactor by electron microscopy. *Bioresource Technology* 99:922-929.
- Banerjee R. y Ragsdale S. W. (2003).** The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annual Reviews of Biochemistry* 72:209-247.
- Banerji S. K. y Bajpai R. K. (1994).** Cometabolism of pentachlorophenol by microbial species. *Journal of Hazardous Materials* 39:19-31.
- Batstone D. J., Keller J., Angelidaki I., Kalyuzhnyi S. V., Pavlostathis S. G., Rozzi A., Sanders W. T. M., (...) y Vavilin V. A. (2002).** The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Science and Technology*. 45(10):65-73.
- Bautista P., Mohedano A. F., Gilarranz M. A., Casas J. A. y Rodriguez J. J. (2007).** Application of Fenton oxidation to cosmetic wastewaters treatment. *Journal of Hazardous Materials* 143:128-134.
- Bautista P., Mohedano A. F., Casas J. A., Zazo J. A. y Rodriguez J. J. (2010a).** Oxidation of cosmetic wastewaters with H₂O₂ using a Fe/gamma-Al₂O₃ catalyst. *Water Science and Technology* 61:1631-1636.
- Bautista P., Mohedano A. F., Menendez N., Casas J. A. y Rodriguez J. J. (2010).** Catalytic wet peroxide oxidation of cosmetic wastewaters with Fe-bearing catalysts. *Catalysis Today* 151:148-152.
- Beaudet R., Lévesque M. J., Villemur R., Lanthier M., Chénier M., Lépine F. y Bisaillon J. G. (1998).** Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a contaminated soil inoculated with a methanogenic consortium or with *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1. *Applied microbiology and biotechnology* 50:135-141.
- Beefink H. H. y van den Heuvel J. C. (1990).** Bacterial aggregates of various and varying size and density: a structured model for biomass retention. *The Chemical Engineering Journal* 44:B1-B13.
- Behrens S., Fuchs B. M., Mueller F. y Amann R. (2003).** Is the In Situ Accessibility of the 16S rRNA of *Escherichia coli* for Cy3-Labeled Oligonucleotide Probes Predicted by a Three-Dimensional Structure Model of the 30S Ribosomal Subunit? *Applied and Environmental Microbiology* 69:4935-4941.

- Bello-Mendoza R. y Castillo-Rivera M. F. (1998).** Start-up of an Anaerobic Hybrid (UASB/Filter) Reactor Treating Wastewater from a Coffee Processing Plant. *Anaerobe* 4:219-225.
- Beltrame P., Beltrame P. L., Carniti P. y Pitea D. (1982).** Kinetics of biodegradation of mixtures containing 2,4-dichlorophenol in a continuous stirred reactor. *Water Research* 16:429-433.
- Beltran J., Gonzalez T. y Garcia J. (2008).** Kinetics of the biodegradation of green table olive wastewaters by aerobic and anaerobic treatments. *Journal of Hazardous Materials* 154:839-845.
- Bennett G. F. (2006).** Book Review: Ozone reaction kinetics for water and wastewater systems. *Journal of Hazardous Materials* 128:295-295.
- Berestovskaia I. I., Ignatov V. V., Markina L. N., Kamnev A. A. y Makarov O. E. (2000).** [Destruction of chlorinated derivatives of phenol: ortho-chlorophenol, para-chlorophenol, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by bacteria communities in anaerobic sludge]. *Mikrobiologiya* 69:483-487.
- Bernet N., Delgenes N., Akunna J. C., Delgenes J. P. y Moletta R. (2000).** Combined anaerobic-aerobic SBR for the treatment of piggery wastewater. *Water Research* 34:611-619.
- Bestetti G., Galli E., Leoni B., Pelizzoni F. y Sello G. (1992).** Regioselective hydroxylation of chlorobenzene and chlorophenols by a *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37:260-263.
- Bilgili M. S. (2006).** Adsorption of 4-chlorophenol from aqueous solutions by xad-4 resin: Isotherm, kinetic, and thermodynamic analysis. *Journal of Hazardous Materials* 137:157-164.
- Borja R., Martin A., Sanchez E., Rincon B. y Raposo F. (2005).** Kinetic modelling of the hydrolysis, acidogenic and methanogenic steps in the anaerobic digestion of two-phase olive pomace. *Process Biochemistry* 40:1841-1847.
- Bouchard B., Beaudet R., Villemur R., McSween G., Lepine F. y Bisaillon J. G. (1996).** Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:1010-1015.

- Bouchez T., Patureau D., Dabert P., Juretschko S., Dore J., Delgenes P., Moletta R. y Wagner M. (2000a).** Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environmental Microbiology* 2:179-190.
- Bouchez T., Patureau D., Dabert P., Wagner M., Delgenes J. P. y Moletta R. (2000b).** Successful and unsuccessful bioaugmentation experiments monitored by fluorescent in situ hybridization. *Water Science and Technology* 41:61-68.
- Boyd S. A. y Shelton D. R. (1984).** Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 47:272-277.
- Boyer A., Page-Belanger R., Saucier M., Villemur R., Lepine F., Juteau P. y Beaudet R. (2003).** Purification, cloning and sequencing of an enzyme mediating the reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol from *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Biochemical Journal* 373:297-303.
- Brás R., Gomes A., Ferra M. I. A., Pinheiro H. M. y Gonçalves I. C. (2005).** Monoazo and diazo dye decolourisation studies in a methanogenic UASB reactor. *Journal of Biotechnology*. 115:57-66.
- Breitenstein A., Saano A., Salkinoja-Salonen M., Andreesen J. R. y Lechner U. (2001).** Analysis of a 2,4,6-trichlorophenoldehalogenating enrichment culture and isolation of the dehalogenating member *Desulfitobacterium frappieri* strain TCP-A. *Archives of Microbiology* 175: 133-142.
- Buitron G., Schoeba M. E., Moreno-Andrade I. y Moreno J. A. (2005).** Evaluation of two control strategies for a sequencing batch reactor degrading high concentration peaks of 4-chlorophenol. *Water Research* 39:1015-1024.
- Cai J. (1998).** Coke-chemical wastewater treatment with the three-phase air lift-loop reactor. *Fuel and Energy Abstracts* 39:218-218.
- Caixeta C. E. T., Cammarota M. C. y Xavier A. M. F. (2002).** Slaughterhouse wastewater treatment: evaluation of a new three-phase separation system in a UASB reactor. *Bioresource Technology* 81:61-69.
- Calli B., Mertoglu B., Roest K. y Inanc B. (2006).** Comparison of longterm performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate. *Bioresource Technology* 97:641-647.

- Calvo L., Mohedano A. F., Casas J. A., Gilarranz, M. A. y Rodriguez J. J. (2004).** Treatment of chlorophenols-bearing wastewaters through hydrodechlorination using Pd activated carbon catalysts. *Carbon* 42:1377-1381.
- Calvo L., Gilarranz M. A., Casas J. A., Mohedano A. F. y Rodriguez J. J. (2006).** Hydrodechlorination of 4-chlorophenol in aqueous phase using Pd/AC catalysts prepared with modified active carbon supports. *Applied Catalysis B, Environmental* 67:68-76.
- Calvo B., Canoira L., Morante F., Martínez-Bedia J. M., Vinagre C., García-González J.- E., Elsen J. y Alcantara R. (2009a).** Continuous elimination of Pb²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, H⁺ and NH₄⁺ from acidic waters by ionic exchange on natural zeolites. *Journal of Hazardous Materials* 166:619-627.
- Calvo L., Gilarranz M. A., Casas J. A., Mohedano A. F. y Rodriguez J. J. (2009b).** Hydrodechlorination of 4-chlorophenol in water with formic acid using a Pd/activated carbon catalyst. *Journal of Hazardous Materials* 161:842-847.
- Carucci A., Manconi I. y Manigas L. (2007).** Use of membrane bioreactors for the bioremediation of chlorinated compounds polluted groundwater. *Water Science and Technology* 55:209-216.
- Chaliha S. y Bhattacharyya K. G. (2008).** Catalytic wet oxidation of 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol in water with Mn(II)-MCM41. *Chemical Engineering Journal* 139:575-588.
- Chaliha S. y Bhattacharyya K. G. (2009).** Fe(III)-, Co(II)- and Ni(II)-impregnated MCM41 for wet oxidative destruction of 2,4-dichlorophenol in water. *Catalysis Today* 141:225-233.
- Chamy R., Pizarro C., Vivanco E., Schiappacasse M. C., Jeison D., Poirrier P. y Ruiz-Filippi G. (2007).** Selected experiences in Chile for the application of UASB technology for vinasse treatment. *Water Science and Technology* 56(2):39-48.
- Chang Y. -J., Nishio N. y Nagai S. (1995).** Characteristics of Granular Methanogenic Sludge Grown on Phenol Synthetic Medium and Methanogenic Fermentation of phenolic wastewater in a UASB reactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79:348-353.

- Chang B. V., Chiang C. W. y Yuan S. Y. (1999).** Microbial dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol in anaerobic sewage sludge. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes* 34:491-507.
- Chen Y. R. y Hashimoto A. G. (1980).** Substrate utilization kinetic model for biological treatment process. *Biotechnology and Bioengineering* 22:2081-2095.
- Chen J., Jiang J., Zhang F., Yu H. y Zhang J. (2004).** Cytotoxic effects of environmentally relevant chlorophenols on L929 cells and their mechanisms. *Cell Biology and Toxicology* 20:183-196.
- Chen Y., Cheng J. J. y Creamer K. S. (2008).** Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99: 4044-4064.
- Chen G. C., Shan X. Q., Wang Y. S., Wen B., Pei Z. G., Xie Y. N., Liu T. y Pignatello J. J. (2009).** Adsorption of 2,4,6-trichlorophenol by multi-walled carbon nanotubes as affected by Cu(II). *Water Research* 43:2409-2418.
- Chinnaraj S. y Venkoba Rao G. (2006).** Implementation of an UASB anaerobic digester at bagasse-based pulp and paper industry. *Biomass and Bioenergy* 30:273-277.
- Choi J. H., Kim Y. H. y Choi S. J. (2007).** Reductive dechlorination and biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol using sequential permeable reactive barriers: laboratory studies. *Chemosphere* 67:1551-1557.
- Chowdhury P. y Viraraghavan T. (2009).** Sonochemical degradation of chlorinated organic compounds, phenolic compounds and organic dyes - A review. *Science of the Total Environment* 407:2474-2492.
- Christiansen N. y Ahring B. K. (1996a).** *Desulfitobacterium hafniense* sp nov, an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:442-448.
- Christiansen N. y Ahring B. K. (1996b)** Introduction of a de novo bioremediation activity into anaerobic granular sludge using the dechlorinating bacterium DCB-2. *International Journal of General and Molecular Microbiology* 69:61-66.
- Christiansen N., Hendriksen H. V., Jarvinen K. T. y Ahring B. K. (1995).** Degradation of chlorinated aromatic compounds in UASB reactors. *Water Science and Technology* 31(1):249-259.

- Christiansen N., Ahring B. K., Wohlfarth G. y Diekert G. (1998).** Purification and characterization of the 3-chloro-4-hydroxy-phenylacetate reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium hafniense*. FEBS Letters 436:159-162.
- Chudoba J., Albokova J., Lentge B y Kummel R. (1989).** Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by activated sludge microorganisms. Water Research 23:1439-1442.
- Cobos-Vasconcelos D. D. L., Santoyo-Tepole F., Juarez-Ramirez C., Ruiz-Ordaz N., y Galindez-Mayer C. J. J. (2006).** Cometabolic degradation of chlorophenols by a strain of *Burkholderia* in fed-batch culture. Enzyme and Microbial Technology 40:57-60.
- Codina J. C., Munoz M. A., Cazorla, F. M., Perez-Garcia A., Morinigo M. A. y de Vicente A. (1998).** The inhibition of methanogenic activity from anaerobic domestic sludges as a simple toxicity bioassay. Water Research 32:1338-1342.
- Coelho N. M., Rodrigues A. A., Arroja L. M. y Capela I. F. (2007).** Effect of non-feeding period length on the intermittent operation of UASB reactors treating dairy effluents. Biotechnology and Bioengineering 96:244-249.
- Cole J. R., Cascarelli A. L., Mohn W. W. y Tiedje J. M. (1994).** Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. Applied and Environmental Microbiology 60:3536-3542.
- Collins G., Foy C., McHugh S. y O'Flaherty V. (2005).** Anaerobic treatment of 2,4,6-trichlorophenol in an expanded granular sludge bed-anaerobic filter (EGSB-AF) bioreactor at 15° C. FEMS Microbiology Ecology 53:167-178.
- Contois D. E. (1959).** Kinetics of bacterial growth: relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures. Journal of General Microbiology 21:40-50.
- Cooper G. S. y Jones S. (2008).** Pentachlorophenol and cancer risk: Focusing the lens on specific chlorophenols and contaminants. Environmental Health Perspectives 116:1001-1008.
- Cortez S., Teixeira P. Oliveira R. y Mota M. (2008).** Rotating biological contactors: A review on main factors affecting performance. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 7:155-172.
- Cronin C. y Lo K. V. (1998).** Anaerobic treatment of brewery wastewater using UASB reactors seeded with activated sludge. Bioresource Technology 64:33-38.

- Culubret E. N., Luz M., Amils R. y Sanz J. L. (2001).** Biodegradation of 1,1,1,2-tetrachloroethane under methanogenic conditions. *Water Science and Technology* 44:117-122.
- Damianovic M. H. R. Z., Moraes E. M., Zaiat M. y Foresti E. (2009).** Pentachlorophenol (PCP) dechlorination in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactors. *Bioresource Technology* 100:4361-4367.
- Deng C. J., Liu R. H. y Cai J. M. (2008).** State of art of biomass fast pyrolysis for bio-oil in China: a review. *Journal of the Energy Institute* 81:211-217.
- Deshmukh N. S., Lapsiya K. L., Savant D. V., Chiplonkar S. A., Yeole T. Y., Dhakephalkar P. K. y Ranade D. R. (2009).** Upflow anaerobic filter for the degradation of adsorbable organic halides (AOX) from bleach composite wastewater of pulp and paper industry. *Chemosphere* 75:1179-1185.
- Detomaso A., Lopez A., Lovecchio G., Mascolo G. y Curci R. (2003).** Practical applications of the Fenton reaction to the removal of chlorinated aromatic pollutants. Oxidative degradation of 2,4-dichlorophenol. *Environmental Science and Pollution Research International* 10:379-384.
- Deweerd K. A., Mandelco L., Tanner R. S., Woese C. R. y Suflita J. M. (1991).** *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology* 154:23-30.
- Díaz E., Amils R. y Sanz J. L. (2003).** Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. *Water Science and Technology* 48(6):57-64.
- Díaz E., Stams A. J. M., Amils R., y Sanz J. L. (2006).** Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 72:4942-4949.
- Díaz E., Mohedano A. F., Calvo L., Gilarranz M. A., Casas J. A. y Rodríguez J. J. (2007).** Hydrogenation of phenol in aqueous phase with palladium on activated carbon catalysts. *Chemical Engineering Journal* 131:65-71.
- Díaz E., Casas J. A., Mohedano A. F., Calvo L., Gilarranz M. A., y Rodríguez. J. J. (2008).** Kinetics of the hydrodechlorination of 4-chlorophenol in water using Pd, Pt and RhAl₂O₃ catalysts. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 47:3840-3846.

- Díaz E., Casas J. A., Mohedano A. F., Calvo L., Gilarranz M. A. y Rodríguez J. J. (2009).** Kinetics of 4-chlorophenol hydrodechlorination with alumina and activated carbon-supported Pd and Rh catalysts. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 48:3351-3358.
- Dietrich G. y Winter J. (1990).** Anaerobic degradation of chlorophenol by an enrichment culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34:253-258.
- Dolfing J. y Harrison B. K. (1992).** Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential role as electron acceptors in anaerobic environments. *Environmental Science and Technology* 26:2213-2218.
- dos Santos A. B., Cervantes F. J., Yaya-Beas R. E. y van Lier J. B. (2003).** Effect of redox mediator, AQDS, on the decolourisation of a reactive azo dye containing triazine group in a thermophilic anaerobic EGSB reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 33:942-951.
- Dou J., Liu X. y Hu Z. (2008).** Substrate interactions during anaerobic biodegradation of BTEX by the mixed cultures under nitrate reducing conditions. *Journal of Hazardous Materials* 158:264-272.
- Dou J., Liu X., Hu Z. y Deng D. (2008).** Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction. *Journal of Hazardous Materials* 151:720-729.
- Drewniak L., Styczek A., Majder-Lopatka M. y Skłodowska A. (2008).** Bacteria, hypertolerant to arsenic in the rocks of an ancient gold mine, and their potential role in dissemination of arsenic pollution. *Environmental Pollution* 156:1069-1074.
- Duff S. J. B., Kennedy K. J. y Brady A. J. (1995).** Treatment of dilute phenol/PCP wastewaters using the upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Water Research* 29:645-651.
- Dutka B. J., Nyholm N. y Petersen J. (1983).** Comparison of several microbiological toxicity screening-tests. *Water Research* 17:1363-1368.
- Eapen S., Singh S. y D'Souza S. F. (2007).** Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnology Advances* 25:442-451.
- Edgehill R. U. y Finn R. K. (1982).** Isolation, characterization and growth-kinetics of bacteria metabolizing pentachlorophenol. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 16:179-184.

- Edgehill R. U. y Finn R. K. (1983).** Activated sludge treatment of synthetic waste water containing pentachlorophenol. *Biotechnology and Bioengineering* 25:2165-2176.
- Eker S. y Kargi F. (2006).** Kinetic modeling and parameter estimation in biological treatment of 2,4-dichlorophenol containing wastewater using rotating perforated tubes biofilm reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 38:860-866.
- El Fantroussi S. y Agathos S. N. (2005).** Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology* 8:268-275.
- El Fantroussi S., Naveau H. y Agathos S. N. (1998).** Anaerobic dechlorinating bacteria. *Biotechnology progress* 14:167-188.
- El-Gohary F., Tawfik A., Badawy M. y El-Khateeb M. A. (2009).** Potentials of anaerobic treatment for catalytically oxidized olive mill wastewater (OMW). *Bioresource Technology* 100:2147-2154.
- Estevinho B. N., Martins I., Ratola N., Alves A. y Santos L. (2007).** Removal of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol from waters by sorption using coal fly ash from a Portuguese thermal power plant. *Journal of Hazardous Materials* 143:535-540.
- Fahmy M., Kut O. M. y Heinzle E. (1994).** Anaerobic-aerobic fluidized bed biotreatment of sulphite pulp bleaching effluents-II. Fate of individual chlorophenolic compounds. *Water Research* 28:1997-2010.
- Fang H. H. P., Lau L. W. C. y Chung D. W. C. (1997).** Inhibition of methanogenic activity of starch-degrading granules by aromatic pollutants. *Water Science and Technology* 35(8):247-253.
- Farrell A. y Quilty B. (2002).** The enhancement of 2-chlorophenol degradation by a mixed microbial community when augmented with *Pseudomonas putida* CP1. *Water Research* 36:2443-2450.
- Fathepure B. Z. y Boyd S. A. (1988).** Dependence of tetrachloroethylene dechlorination on methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina* sp. strain DCM. *Applied and Environmental Microbiology* 54 :2976-2980.
- Felis V., De Bellefon C., Fouilloux P. y Schweich D. (1999).** Hydrodechlorination and hydrodearomatisation of monoaromatic chlorophenols into cyclohexanol on Ru/C catalysts applied to water depollution: influence of the basic solvent and kinetics of the reactions. *Applied Catalysis B: Environmental* 20:91-100.

- Fernández N., Díaz E. E., Amils R. y Sanz J. L. (2008a).** Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microbial Ecology* 56:121-132.
- Fernandez N., Sierra-Alvarez R., Field J. A., Amils R. y Sanz J. L. (2008b).** Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. *Chemosphere* 70:462-474.
- Fernández N., Sierra-Alvarez R., Amils R., Field J. A. y Sanz J. L. (2009).** Compared microbiology of granular sludge under autotrophic, mixotrophic and heterotrophic denitrification conditions. *Water Science and Technology* 59(6):1227-1236.
- Ferry G. F. (1999).** Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiology Reviews* 23:13-38.
- Fezzani B. y Cheikh R. B. (2009).** Extension of the anaerobic digestion model No. 1 (ADM1) to include phenolic compounds biodegradation processes for the simulation of anaerobic co-digestion of olive mill wastes at thermophilic temperature. *Journal of Hazardous Materials* 162:1563-1570.
- Field J. A. y Sierra-Alvarez R. (2008).** Microbial degradation of chlorinated phenols. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7:211-241.
- Finkel'shtein Z. I., Baskunov B. P., Golovlev E. L., Moiseeva O. V., Vervoort J., Rietjens I. y Golovleva L. A. (2000).** Dependence of the conversion of chlorophenols by *rhodococci* on the number and position of chlorine atoms in the aromatic ring. *Microbiology* 69:40-47.
- Flapper T. G., Ashbolt N. J., Lee A. T. y O'Neill M. (2001).** From the lab to full-scale SBR operation: treating high strength and variable industrial wastewaters. *Water Science and Technology* 43(3):347-354.
- Fountoulakis M. S., Stamatelatou K., y Lyberatos G. (2008).** The effect of pharmaceuticals on the kinetics of methanogenesis and acetogenesis. *Bioresource Technology* 99:7083-7090.
- Franklin R. J., Koevoets W. A. A., van Gils W. M. A. y van der Pas A. (1992).** Application of the BIOBED Upflow Fluidized Bed Process for anaerobic wastewater treatment. *Water Science and Technology* 25(7):373-382.
- Fuchs B. M., Wallner G., Beisker W., Schwiopl I., Ludwig W. y Amann R. (1998).** Flow Cytometric Analysis of the In Situ Accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for

- Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology* 64:4973-4982.
- Gali A., Benabdallah T., Astals S. y Mata-Alvarez J. (2009).** Modified version of ADM1 model for agro-waste application. *Bioresource Technology* 100:2783-2790.
- Gallego A., Gómez C. E., Fortunato M. S., Cenzano L., Rossi S., Paglilla M., Gómez Hermida D. G., Higa L. E. y Korol S. E. (2001).** Factors affecting biodegradation of 2-chlorophenol by *Alcaligenes* sp. in aerobic reactors. *Environmental Toxicology* 16:306-313.
- Gander M., Jefferson B. y Judd S. (2000).** Aerobic MBRs for domestic wastewater treatment: a review with cost considerations. *Separation and Purification Technology* 18:119-130.
- Garcia H., Rico C., Garcia P. A. y Rico J. L. (2008).** Flocculants effect in biomass retention in a UASB reactor treating dairy manure. *Bioresource Technology* 99:6028-6036.
- Garcia-Molina V., Kallas J. y Esplugas S. (2007).** Wet oxidation of 4-chlorophenol. *Chemical Engineering Journal* 126:59-65.
- García-Ochoa F., Santos V. E., Naval L., Guardiola E. y López B. (1999).** Kinetic model for anaerobic digestion of livestock manure. *Enzyme and Microbial Technology* 25:55-60.
- Gardin H., Lebeault J. M. y Pauss A. (2001).** Degradation of 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) by co-immobilization of anaerobic and aerobic microbial communities in an upflow reactor under air-limited conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56:524-530.
- Garibay-Orijel C., Hoyo-Vadillo C., Ponce-Noyola T., García-Mena J. y Poggi-Varaldo H. M. (2006).** Impact of long-term partial aeration on the removal of 2,4,6-trichlorophenol in an initially methanogenic fluidized bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 94:949-960.
- Gavala H. N., Angelidaki I. y Ahring B. K. (2003).** Kinetics & modeling of Anaerobic Digestion Process. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 81:58-93.
- Gerritse J., Renard V., Gomes T. M. P., Lawson P. A., Collins M. D. y Gottschal J. C. (1996).** *Desulfitobacterium* sp strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or ortho-chlorinated phenols. *Archives of Microbiology* 165:132-140.

- Ghaly M. Y., Härtel G., Mayer R. y Haseneder R. (2001).** Photochemical oxidation of p-chlorophenol by UV/H₂O₂ and photo-Fenton process. A comparative study. *Waste Management* 21:41-47.
- Ghatbandhe A. S. y Yenkie M. K. N. (2008).** 2, 4 dichlorophenol (2, 4-DCP) sorption from aqueous solution using granular activated carbon and polymeric adsorbents and studies on effect of temperature on activated carbon adsorption. *Journal of Environmental Science and Engineering* 50:163-168.
- Golovleva L. A., Zaborina O., Pertsova R., Baskunov B., Schurukhin Y. y Kuzmin S. (1991).** Degradation of polychlorinated phenols by *Streptomyces rochei* 303. *Biodegradation* 2:201-208.
- Gomes A. C., Gonçalves I. C., de Pinho M. N. y Porter J. J. (2007).** Integrated nanofiltration and upflow anaerobic sludge blanket treatment of textile wastewater for in-plant reuse. *Water Environment Research* 79(5):498-506.
- Goncalves L. M. D., Xavier A. M. R. B., Almeida J. S. y Carrondo M. J. T. (1991).** Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology* 13:314-319.
- Gong J., Liu Y. y Sun X. (2008).** O₃ and UV/O₃ oxidation of organic constituents of biotreated municipal wastewater. *Water Research* 42:1238-1244.
- González-Gil G. Lens P. N. L., van Aelst A., van As H., Versprille A. I. y Lettinga G. (2001).** Cluster structure of anaerobic aggregates of an expanded granular sludge bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3683-3692.
- Goswami M., Shivaraman N. y Singh R. P. (2005).** Microbial metabolism of 2-chlorophenol, phenol and rho-cresol by *Rhodococcus erythropolis* M1 in co-culture with *Pseudomonas fluorescens* P1. *Microbiological Research* 160:101-109.
- Grau P., Dohanyos M. y Chudoba J. (1975).** Kinetics of multicomponent substrate removal by activated sludge. *Water Research* 9:637-642.
- Grey R., Höfer C. y Schlosser D. (1998).** Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2-chloro-1,4-benzoquinone by mycelia and cell-free crude culture liquids of *Trametes versicolor* in relation to extracellular laccase activity. *Journal of Basic Microbiology* 38:371-382.
- Guiot S. R., Tartakovsky B., Lanthier M., Lévesque M. J., Manuel M. F., Beaudet R., Greer C. W. y Villemur R. (2002)** Strategies for augmenting the pentachlorophenol

- degradation potential of UASB anaerobic granules. *Water Science and Technology* 45(10):35-41.
- Habashi F.** (2005). A short history of hydrometallurgy. *Hydrometallurgy* 79:15-22.
- Hagblom M. M. y Young L. Y.** (1995). Anaerobic degradation of halogenated phenols by sulfate-reducing consortia. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1546-1550.
- Hahn D., Cozzolino A., Piccolo A. y Armenante P. M.** (2007). Reduction of 2,4-dichlorophenol toxicity to *Pseudomonas putida* after oxidative incubation with humic substances and a biomimetic catalyst. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66:335-342.
- Hameed B. H.** (2007). Equilibrium and kinetics studies of 2,4,6-trichlorophenol adsorption onto activated clay. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 307:45-52.
- Hameed B. H., Chin L. H. y Rengaraj S.** (2008a). Adsorption of 4-chlorophenol onto activated carbon prepared from rattan sawdust. *Desalination* 225:185-198.
- Hameed B. H., Tan I. A. W. y Ahmad A. L.** (2008b). Adsorption isotherm, kinetic modeling and mechanism of 2,4,6-trichlorophenol on coconut husk-based activated carbon. *Chemical Engineering Journal* 144:235-244.
- Han K. y Levenspiel O.** (1988). Extended Monod kinetics for substrate, product and cell inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* 32:430-437.
- Hao X. L., Zhou M. H. y Lei L. C.** (2007). Non-thermal plasma-induced photocatalytic degradation of 4-chlorophenol in water. *Journal of Hazardous Materials* 141:475-482.
- Hawari A. H. y Mulligan C. N.** (2006). Biosorption of lead(II), cadmium(II), copper(II) and nickel(II) by anaerobic granular biomass. *Bioresource Technology* 97:692-700.
- Hawari A. H. y Mulligan C. N.** (2007). Effect of the presence of lead on the biosorption of copper, cadmium and nickel by anaerobic biomass. *Process Biochemistry* 42:1546-1552.
- He Q. y Sanford R. A.** (2002). Induction characteristics of reductive dehalogenation in the ortho-halophenol-respiring bacterium, *Anaeromyxobacter dehalogenans*. *Biodegradation* 13:307-316.

- He Q. y Sanford R. A. (2003).** Characterization of Fe(III) reduction by chlororespiring *Anaeromyxobacter dehalogenans*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2712-2718.
- He Q. y Sanford R. A. (2004).** The generation of high biomass from chlororespiring bacteria using a continuous fed-batch bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:377-382.
- Hendriksen H. V. y Ahring B. K. (1992).** Metabolism and kinetics of pentachlorophenol transformation in anaerobic granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37:662-666.
- Hendriksen H. V., Larsen S. y Ahring B. K. (1992).** Influence of a supplemental carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 58:365-370.
- Hill A. V. (1910).** The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *The Journal of Physiology* 40:i-vii.
- Holliger C., Wohlfarth G. y Diekert G. (1998).** Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 22: 383-398.
- Horber C., Christiansen N. Arvin E. y Ahring B. (1998).** Improved dechlorinating performance of upflow anaerobic sludge blanket reactors by incorporation of *Dehalospirillum multivorans* into granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1860-1863.
- Hu Z. C., Korus R. A., Levinson W. E. y Crawford R. L. (1994).** Adsorption and biodegradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized *Flavobacterium*. *Environmental Science and Technology* 28:491-496.
- Hu J. -Y., Aizawa T., Ookubo Y., Morita T. y Magara Y. (1998).** Adsorptive characteristics of ionogenic aromatic pesticides in water on powdered activated carbon. *Water Research* 32:2593-2600.
- Hu X. -H., Wang K. y Chen W. -S. (2008).** Treatment of wastewater from ice cream production using air flotation-UASB-biological contact oxidation process. *Industrial Water and Wastewater* 39:80-82.
- Hulshoff Pol L. W., de Castro Lopes S. I., Lettinga G. y Lens P. N. L. (2004).** Anaerobic sludge granulation. *Water Research* 38:1376-1389.

- Isik M. y Sponza D. T. (2005).** A batch study for assessing the inhibition effect of Direct Yellow 12 in a mixed methanogenic culture. *Process Biochemistry* 40:1053-1062.
- James A., Chernicharo C. A. L. y Campos C. M. M. (1990).** The development of a new methodology for the assessment of specific methanogenic activity. *Water Research* 24:813-825.
- Jansson B., Sundstrom G. y Ahling B. (1978).** Formation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins during combustion of chlorophenol formulations. *Science of the Total Environment* 10:209-217.
- Jin P. y Bhattacharya S. K. (1996).** Anaerobic removal of pentachlorophenol in presence of zinc. *Journal of Environmental Engineering* 122:590–598.
- Jin P. y Bhattacharya S. K. (1997).** Toxicity and Biodegradation of Chlorophenols in Anaerobic Propionate Enrichment Culture. *Water Environment Research* 69:938-947.
- Jin P., Bhattacharya S. K., Williams C. J. y Zhang H. (1998).** Effects of sulfide addition on copper inhibition in methanogenic systems. *Water Research* 32:977-988.
- Jiuhui Q. (2008).** Research progress of novel adsorption processes in water purification: A review. *Journal of Environmental Sciences* 20:1-13.
- Johnson, L. D. y Young, J. C. (1983).** Inhibition of anaerobic digestion by organic priority pollutants. *Journal of Water Pollution Control Federation* 55:1441–1449.
- Kalyuzhnyi S. V. (1997).** Batch anaerobic digestion of glucose and its mathematical modeling. II. Description, verification and application of model. *Bioresource Technology* 59:249-258.
- Kalyuzhnyi S. V., y Davlyatshina M. A. (1997).** Batch anaerobic digestion of glucose and its mathematical modeling. I. kinetic investigations. *Bioresource Technology* 59:73-80.
- Kao C. M., Liu J. K., Chen Y. L., Chai C. T. y Chen S. C. (2005).** Factors affecting the biodegradation of PCP by *Pseudomonas mendocina* NSYSU. *Journal of Hazardous Materials* 124:68-73.
- Karamanev D. G. y Samson R. (1998).** High-rate biodegradation of pentachlorophenol by biofilm developed in the immobilized soil bioreactor. *Environmental Science and Technology* 32:994-999.

- Kargi F. y Eker S. (2004).** Toxicity and batch biodegradation kinetics of 2,4 dichlorophenol by pure *Pseudomonas putida* culture. *Enzyme and Microbial Technology* 35:424-428.
- Karns J. S., Duttagupta S. y Chakrabarty A. M. (1983).** Regulation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and chlorophenol metabolism in *Pseudomonas cepacia* AC1100. *Applied and Environmental Microbiology* 46:1182-1186.
- Kennes C., Wu W. M., Bhatnagar L. y Zeikus J. G. (1996).** Anaerobic dechlorination and mineralization of pentachlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol by methanogenic pentachlorophenol-degrading granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44:801-806.
- Khachatryan L., Lomnicki S. y Dellinger B. (2007).** An expanded reaction kinetic model of the CuO surface-mediated formation of PCDD/F from pyrolysis of 2-chlorophenol. *Chemosphere* 68:1741-1750.
- Khansorhtong S. y Hunsom M. (2009).** Remediation of wastewater from pulp and paper mill industry by the electrochemical technique. *Chemical Engineering Journal* 151:228-234.
- Khodadoust A. P., Wagner J. A., Suidan M. T. y Brenner R. C. (1997).** Anaerobic treatment of PCP in fluidized-bed GAC bioreactors. *Water Research* 31:1776-1786.
- Kim I. S., Young J. C. y Tabak H. H. (1996).** Impact of chloroanilines on hydrogenotrophic methanogenesis in ethanol-enriched cultures. *Water Research* 30:601-612.
- Kim S., Tabak H. H. y Young J. C. (1997).** Modeling of the fate and effect of chlorinated phenols in anaerobic treatment processes. *Water Science and Technology* 36 (6-7):287-294.
- Kim Y., Han K. y Lee W. (2003).** Removal of organics and calcium hardness in liner paper wastewater using UASB and CO₂ stripping system. *Process Biochemistry* 38:925-931.
- Kim T. H., Lee J. K. y Lee M. J. (2007).** Biodegradability enhancement of textile wastewater by electron beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* 76:1037-1041.
- Kiyohara H., Hatta T., Ogawa Y., Kakuda T., Yokoyama H. y Takizawa N. (1992).** Isolation of *Pseudomonas pickettii* strains that degrade 2,4,6-trichlorophenol and

- their dechlorination of chlorophenols. *Applied and Environmental Microbiology* 58:1276-1283.
- Klan P. y Vavrik M. (2006).** Non-catalytic remediation of aqueous solutions by microwave-assisted photolysis in the presence of H₂O₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* 177:24-33.
- Klecka G. M. y Maier W. J. (1985).** Kinetics of microbial growth on pentachlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology* 49:46-53.
- Koh S. C., McCullar M. V. y Focht D. D. (1997).** Biodegradation of 2,4-dichlorophenol through a distal meta-fission pathway. *Applied and Environmental Microbiology* 63:2054-2057.
- Kojima Y., Fukuta T., Yamada T., Onyango M. S., Bernardo E. C., Matsuda H. y Yagishita K. (2005).** Catalytic wet oxidation of o-chlorophenol at mild temperatures under alkaline conditions. *Water Research* 39:29-36.
- Kolaczowski S. T., Plucinski P., Beltran F. J., Rivas F. J. y McLurgh D. B. (1999).** Wet air oxidation: a review of process technologies and aspects in reactor design. *Chemical Engineering Journal* 73:143-160.
- Konya I., Eker S. y Kargi F. (2007).** Mathematical modelling of 4-chlorophenol inhibition on COD and 4-chlorophenol removals in an activated sludge unit. *Journal of Hazardous Materials* 143:233-239.
- Koran K. M., Suidan M. T., Khodadoust A. P., Sorial G. A. y Brenner R. C. (2001).** Effectiveness of an anaerobic granular activated carbon fluidized-bed bioreactor to treat soil wash fluids: a proposed strategy for remediating PCP/PAH contaminated soils. *Water Research* 35:2363-2370.
- Kovenklioglu S., Balko E. N., Hoke J. B., Farrauto R. J. y Gramiccioni G. A. (1993)** Method of hydrodehalogenating halogenated organic compounds in aqueous environmental sources. Engelhard Corporation. United States Patent and Trademark Office Granted Patent. Pat N°:US5196617.
- Krone U. E., Laufer K., Thauer R. K. y Hogenkamp H. P. (1989).** Coenzyme F430 as a possible catalyst for the reductive dehalogenation of chlorinated C1 hydrocarbons in methanogenic bacteria. *Biochemistry* 28:10061-10065.
- Krumme M. L. y Boyd S. A. (1988).** Reductive dechlorination of chlorinated phenols in anaerobic upflow bioreactors. *Water Research* 22:171-177.

- Kuscu O. S. y Sponza D. T. (2009).** Kinetics of para-nitrophenol and chemical oxygen demand removal from synthetic wastewater in an anaerobic migrating blanket reactor. *Journal of Hazardous Materials* 161:787-799.
- Kwon S., Yoo I. K., Lee W. G., Chang H. N. y Chang Y. K. (2001).** High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 73:25-34.
- Lan H. -X., Chen Y. -C., Chen Z. -H. y Chen R. (2005).** Cultivation and characters of aerobic granules for pentachlorophenol (PCP) degradation under microaerobic condition. *Journal of Environmental Sciences (China)* 17: 506-510.
- Langwaldt J. H., Männistö M. K., Wichmann R. y Puhakka J. A. (1998).** Simulation of in situ subsurface biodegradation of polychlorophenols in air-lift percolators. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49:663-668.
- Lanthier M., Villemur R., Lépine F., Bisaillon J.- G. y Beaudet R. (2001).** Geographic distribution of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 and *Desulfitobacterium* spp. in soils from the province of Quebec, Canada. *FEMS Microbiology Ecology* 36:185-191.
- Lanthier M., Tartakovsky B., Villemur R., DeLuca G., y Guiot S. R. (2002).** Microstructure of anaerobic granules bioaugmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Applied and Environmental Microbiology* 68:4035-4043.
- Lanthier M., Juteau P., Lepine F., Beaudet R. y Villemur R. (2005).** *Desulfitobacterium hafniense* is present in a high proportion within the biofilms of a high-performance pentachlorophenol-degrading, methanogenic fixed-film reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1058-1065.
- Lao S. (2002).** Mechanisms of granular activated carbon anaerobic fluidized-bed process for treating phenols wastewater. *Journal of Environmental Sciences (China)* 14:132-135.
- Lecouturier D., Godon J. J. y Lebeault J. M. (2003).** Phylogenetic analysis of an anaerobic microbial consortium deiodinating 5-amino-2,4,6-triiodoisophthalic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62:400-406.
- Lee B. -N., Lou J. -C. y Yen P. -C. (2002).** Catalytic wet oxidation of 2,4-dichlorophenol solutions: activity of the manganese-cerium composite catalyst and biodegradability of the effluent stream. *Water Environment Research* 74(1):28-32.

- Lee M. -Y., Suh C. -W., Ahn Y. -T. y Shin H. -S. (2009a).** Variation of ADM1 by using temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) operation. *Bioresource Technology* 100:2816-2822.
- Lee C., Kim J., Hwang K., O'Flaherty V. y Hwang S. (2009b).** Quantitative analysis of methanogenic community dynamics in three anaerobic batch digesters treating different wastewaters. *Water Research* 43:157-165.
- Lettinga G., van Velsen A. F. M., Hobma S. W., De Zeeuw W. y Klapwijk A. (1980).** Use of upflow sludge blanket reactor concept for biological waste water treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering* 22:699-734.
- Levec J. y Pintar A. (2007).** Catalytic wet-air oxidation processes: A review. *Catalysis Today* 124:172-184.
- Levenspiel O. (1980).** The Monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. *Biotechnology and Bioengineering* 22:1671-1687.
- Leyva-Ramos R., Diaz-Flores P. E., Leyva-Ramos J. y Femat-Flores R. A. (2007).** Kinetic modeling of pentachlorophenol adsorption from aqueous solution on activated carbon fibers. *Carbon* 45:2280-2289.
- Li N., Descorme C. y Besson M. (2007a).** Catalytic wet air oxidation of 2-chlorophenol over Ru loaded $Ce_{x}Zr_{1-x}O_2$ solid solutions. *Applied Catalysis B, Environmental* 76:92-100.
- Li N., Descorme C. y Besson M. (2007b).** Catalytic wet air oxidation of aqueous solution of 2-chlorophenol over Ru/zirconia catalysts. *Applied Catalysis B, Environmental* 71:262-270.
- Li N., Descorme C. y Besson M. (2007c).** Catalytic wet air oxidation of chlorophenols over supported ruthenium catalysts. *Journal of Hazardous Materials* 146:602-609.
- Lin C. -Y. y Chen C. -C. (1999).** Effect of heavy metals on the methanogenic UASB granule. *Water Research* 33:409-416.
- Lin C. Y. y Huang S. D. (2008).** Application of liquid-liquid-liquid microextraction and ion-pair liquid chromatography coupled with photodiode array detection for the determination of chlorophenols in water. *Journal of Chromatography A*, 1193:79-84.
- Liu Y. y Tay J. -H. (2001).** Strategy for minimization of excess sludge production from the activated sludge process. *Biotechnology Advances* 19:97-107.

- Liu Y., Xu H. -L., Yang S. -F. y Tay J. -H. (2003).** Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Research* 37:661-673.
- Liu H., Li G., Li X. y Chen J. (2008).** Molecular characterization of bacterial community in aerobic granular sludge stressed by pentachlorophenol. *Journal of Environmental Sciences (China)* 20:1243-1249.
- Löffler F. E., Sanford R. A. y Tiedje J. M. (1996).** Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3809-3813.
- Loh K. C. y Wu T. T. (2006).** Cometabolic transformation of 2- chlorophenol and 4-chlorophenol in the presence of phenol by *Pseudomonas putida*. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 84:356-367.
- Lokshina L.Y. y Vavilin V.A. (1999).** Kinetic analysis of the key stages of low temperature methanogenesis. *Ecological Modelling* 117:285-303.
- Lokshina L. Y., Vavilin V. A., Kettunen R. H., Rintala J. A., Holliger C. y Nozhevnikova A. N. (2001).** Evaluation of kinetic coefficients using integrated monod and haldane models for low-temperature acetoclastic methanogenesis. *Water Research* 35:2913-2922.
- López I., Passeggi, M., Pedezert A. y Borzacconi L. (2009).** Assessment on the performance of a series of two UASB reactors compared against one of the same total volume using Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Science and Technology* 59:647-652.
- Luong, J. H. (1987).** Generalization of monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* 29:242-248.
- Madsen T. y Licht D. (1992).** Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2874-2878.
- Magar V. S., Stensel H. D., Puhakka J. A. y Ferguson J. F. (1999).** Sequential anaerobic dechlorination of pentachlorophenol: competitive inhibition effect and a kinetic model. *Environmental Science and Technology* 33:1604-1611.
- Mahadevaswamy M., Murthy B. M. S. y Girijamma A. R. (2004).** Performance evaluation of up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor for treatment of paper mill wastewater. *Journal of Environmental Sciences (China)* 16:194-198.

- Majumder S. y Gupta S. K. (2007).** Removal of chlorophenols in sequential anaerobic-aerobic reactors. *Bioresource Technology* 98:118-129.
- Majumder S. y Gupta S. K. (2008).** Degradation of 4-chlorophenol in UASB reactor under methanogenic conditions. *Bioresource Technology* 99:4169-4177.
- Majumder S. y Gupta S. K. (2009).** Effect of influent pH and alkalinity on the removal of chlorophenols in sequential anaerobic-aerobic reactors. *Bioresource Technology* 100:1881-1883.
- Mangrulkar P. A., Kamble S. P., Meshram J. y Rayalu S. S. (2008).** Adsorption of phenol and o-chlorophenol by mesoporous MCM-41. *Journal of Hazardous Materials* 160:414-421.
- Manjunath N. T., Mehrotra I. y Mathur R. P. (2000).** Treatment of wastewater from slaughterhouse by DAF-UASB system. *Water Research* 34:1930-1936.
- Mankad T., Bungay H. R. (1988).** Models for microbial growth with more than one limiting nutrient. *Journal of Biotechnology* 7:161-166.
- Marouf R., Khelifa N., Marouf-Khelifa K., Schott J. y Khelifa A. (2006).** Removal of pentachlorophenol from aqueous solutions by dolomitic sorbents. *Journal of Colloid and Interface Science* 297:45-53.
- Martinez S., Cuervo-Lopez F. M. y Gomez J. (2007).** Toluene mineralization by denitrification in an up flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Bioresource Technology* 98:1717-1723.
- Martin-Hernandez M., Carrera J., Perez J. y Suarez-Ojeda M. E. (2009).** Enrichment of a K-strategist microbial population able to biodegrade p-nitrophenol in a sequencing batch reactor. *Water Research* 43:3871-3883.
- Mayer A. M. y Staples R. C. (2002).** Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60:551-565.
- McGee R. D., Drake J. F., Fredrickson A. G. y Tsuchiya H. M. (1972).** Studies in intermicrobial symbiosis, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus casei*. *Canadian Journal of Microbiology* 18:1733-1742.
- McLaughlin H., Farrell A. y Quilty B. (2006).** Bioaugmentation of activated sludge with two *Pseudomonas putida* strains for the degradation of 4-chlorophenol. *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 41:763-777.

- Melin E. S., Ferguson J. F. y Puhakka J. A. (1997).** Pentachlorophenol biodegradation kinetics of an oligotrophic fluidized bed enrichment culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47:675-682.
- Melin E. S., Jarvinen K. T., Puhakka J. A. (1998).** Effects of temperature on chlorophenol biodegradation kinetics in fluidized-bed reactors with different biomass carriers. *Water Research* 32:81-90.
- Méndez-Paz D., Omil F. y Lema J. M. (2005a).** Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under fed-batch and continuous conditions. *Water Research* 39:771-778.
- Méndez-Paz D., Omil F. y Lema J. M. (2005b).** Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under batch conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 36:264-272.
- Merchuk J. C. (2008).** Airlift Bioreactors: Review of Recent Advances. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 81:324-337.
- Middeldorp P. J. M., Luitjen M. L. G. C., van de Pas B. A., van Eekert M. H. A., Kengen S. W. M., Schraa G. y Stams A. J. M. (1999).** Anaerobic microbial reductive dehalogenation of chlorinated ethenes. *Bioremediation Journal* 3:151-169.
- Mills T., Arnold B., Sivakumaran S., Northcott G., Vogeler I., Robinson B., Norling C. y Leonil D. (2006).** Phytoremediation and long-term site management of soil contaminated with pentachlorophenol (PCP) and heavy metals. *Journal of Environmental Management* 79:232-241.
- Mitavskiy B., Chu D. y Zabet R. (2009).** Models of transcription factor binding: Sensitivity of activation functions to model assumptions. *Journal of Theoretical Biology* 257:419-429.
- Mohn W. W., Kennedy K. J. (1992).** Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *Applied and Environmental Microbiology* 58:1367-1370.
- Mohn H., Puhakka J. A., Ferguson J. F. (1999).** Effects of electron donors on degradation of pentachlorophenol in a methanogenic fluidized, bed, reactor. *Environmental Technology* 20:909-920.
- Molina C. B., Casas J. A., Zazo J. A. y Rodriguez, J.J. (2009).** A comparison of Al-Fe and Zr-Fe pillared clays for catalytic wet peroxide oxidation. *Chemical Engineering Journal* 118:29-35.

- Molina C. B., Calvo L., Gilarranz M. A., Casas J. A. y Rodriguez J. J. (2009).** Hydrodechlorination of 4-chlorophenol in aqueous phase with Pt-Al pillared clays using formic acid as hydrogen source. *Applied Clay Science* 45:206-212.
- Monod J. (1950).** La technique de culture continue; theory et applications. *Annals l'Institute Pasteur* 79:390-410.
- Monsalvo V. M., Mohedano A. F., Casas J. A. y Rodriguez J. J. (2009).** Cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol by sequencing batch reactors at different temperatures. *Bioresource Technology* 100:4572-4578.
- Moreno-Andrade I. y Buitrón G. (2004).** Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Water Science and Technology* 50(10):251-258.
- Morra M. J., Borek V. y Koolpe J. (2000).** Transformation of Chlorinated Hydrocarbons Using Aquocobalamin or Coenzyme F430 in Combination with Zero-Valent Iron. *Journal of Environmental Quality* 29:706-715.
- Mosche M. y Jordening H. -J. (1999).** Comparison of different models of substrate and product inhibition in anaerobic digestion. *Water Research* 33:2545-2554.
- Moser H. (1957).** Structure and dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 22:121-137.
- Moteleb M. A., Suidan M. T., Kim J. y Maloney S. W. (2002).** Pertubated loading of a formaldehyde waste in an anaerobic granular activated carbon fluidized bed reactor. *Water Research* 36:3775-3785.
- Mourao P. A. M., Carrott P. J. M. y Ribeiro Carrott M. M. L. (2006).** Application of different equations to adsorption isotherms of phenolic compounds on activated carbons prepared from cork. *Carbon* 44:2422-2429.
- Moussavi G., Mahmoudi M. y Barikbin B. (2009).** Biological removal of phenol from strong wastewaters using a novel MSBR. *Water Research* 43:1295-1302.
- Mun C. H., Ng W. J. y He J. (2008a).** Acidogenic sequencing batch reactor start-up procedures for induction of 2,4,6-trichlorophenol dechlorination. *Water Research* 42:1675-1683.
- Mun C. H., He J. y Ng, W. J. (2008b).** Pentachlorophenol dechlorination by an acidogenic sludge. *Water Research* 42:3789-3798.

- Na Y. C., Kim K. J., Park C. S. y Hong J. (2007).** Formation of tetrahalogenated dibenzo-p-dioxins (TXDDs) by pyrolysis of a mixture of 2,4,6-trichlorophenol and 2,4,6-tribromophenol. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 80:254-261.
- Nadais H., Capela I., Arroja L. y Duarte A. (2005).** Optimum cycle time for intermittent UASB reactors treating dairy wastewater. *Water Research* 39:1511-1518.
- Naddeo V., Landi M., Belgiorio V. y Napoli R. M. A. (2009).** Wastewater disinfection by combination of ultrasound and ultraviolet irradiation. *Journal of Hazardous Materials* 168:925-929.
- Nelkenbaum E., Dror I. y Berkowitz B. (2007).** Reductive hydrogenation of polycyclic aromatic hydrocarbons catalyzed by metalloporphyrins. *Chemosphere* 68:210-217.
- Neng N. R., Pinto M. L., Pires J., Marcos P. M. y Nogueira J. M. F. (2007).** Development, optimisation and application of polyurethane foams as new polymeric phases for stir bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography. A*, 1171:8-14.
- Neumann A., Wohlfarth G. y Diekert G. (1996).** Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. *Journal of Biological Chemistry* 271:16515-16519.
- Ng A. N. L. y Kim A. S. (2007).** A mini-review of modeling studies on membrane bioreactor (MBR) treatment for municipal wastewaters. *Desalination* 212:261-281.
- Ng W. J., Sim T. S., Ong S. L., Ng K. Y., Ramasamy M. y Tan K. N. (1993).** Efficiency of sequencing batch reactor (SBR) in the removal of selected microorganisms from domestic sewage. *Water Research* 27:1591-1600.
- Nicholson D. K., Woods S. L., Istok J. D. y Peek D. C. (1992).** Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol- acclimated methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2280-2286.
- Ning Z., Kennedy K. J. y Fernandes L. (1997).** Anaerobic degradation kinetics of 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) with linear sorption. *Water Science and Technology* 35:67-75.
- Nollet H. y Verstraete W. (2003).** Development of microbial granules for PCB dechlorination. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 68:185-189.
- Okpokwasili G. C. y Nweke C. O. (2005).** Microbial growth and substrate utilization kinetics. *African Journal of Biotechnology* 5(4):305-317.

- Oktem Y. A., Ince O., Sallis P., Donnelly T. y Ince B. K. (2008).** Anaerobic treatment of a chemical synthesis-based pharmaceutical wastewater in a hybrid upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Bioresource Technology* 99:1089-1096.
- Olguin-Lora P., Puig-Grajales L. y Razo-Flores E. (2003).** Inhibition of the acetoclastic methanogenic activity by phenol and alkyl phenols. *Environmental Technology* 24:999-1006.
- Oliveira R. P., Ghilardi J. A., Ratusznei S. M., Rodrigues J. A. D., Zaiat M. y Foresti E. (2008).** Anaerobic sequencing batch biofilm reactor applied to automobile industry wastewater treatment: Volumetric loading rate and feed strategy effects. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification* 47:1374-1383.
- Orhon D. y Tunay O. (1979).** Mathematical models of biological waste treatment processes for the design of aeration tanks-Discussion. *Water Research* 13:553-556.
- Pace N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734-740.
- Palenzuela-Rollon A., Zeeman G., Lubberding H. J., Lettinga G. y Alaerts G. J. (2002).** Treatment of fish processing wastewater in a one- or two-step upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Water Science and Technology* 45(10):207-212.
- Pamukoglu M. Y. y Kargi F. (2008).** Biodegradation kinetics of 2,4,6-trichlorophenol by *Rhodococcus rhodochrous* in batch culture. *Enzyme and Microbial Technology* 43:43-47.
- Park Y., Skelland A. H. P., Forney L. J. y Kim J. -H. (2006).** Removal of phenol and substituted phenols by newly developed emulsion liquid membrane process. *Water Research* 40:1763-1772.
- Pascal M. C. y Pichinoty F. (1964).** [On the configuration of lactate produced during fermentation of glucose by certain enterobacteria]. *Annales de l'Institut Pasteur* 107:55-62.
- Patel G. B., Agnew B. J. y Dicaire C. J. (1991).** Inhibition of pure cultures of methanogens by benzene ring compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 57:2969-2974.
- Pearce G. (2008).** Introduction to membranes - MBRs: Manufacturers' comparison: part 2 - supplier review. *Filtration and Separation* 45:30-32.

- Pera-Titus M., Garcia-Molina V., Banos M. A., Gimenez J. y Esplugas S. (2004).** Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. *Applied Catalysis B: Environmental* 47:219-256.
- Pereira N. S. y Zaiat M. (2009).** Degradation of formaldehyde in anaerobic sequencing batch biofilm reactor (ASBBR). *Journal of Hazardous Materials* 163:777-782.
- Pereira M. A., Roest K., Stams A. J. M., Mota M., Madalena y Akkermans A. D. L. (2002).** Molecular monitoring of microbial diversity in expanded granular sludge bed (EGSB) reactors treating oleic acid. *FEMS Microbiology Ecology* 41:95-103.
- Perkins P. S., Komisar S. J., Puhakka J. A. y Ferguson J. F. (1994).** Effects of electron donors and inhibitors on reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol. *Water Research* 28:2101-2107.
- Pernyeszi T., Kasteel R., Witthuhn B., Klahre P., Vereecken H. y Klumpp E. (2006).** Organoclays for soil remediation: Adsorption of 2,4-dichlorophenol on organoclay/aquifer material mixtures studied under static and flow conditions. *Applied Clay Science* 32:179-189.
- Petroutsos D., Katapodis P., Samiotaki M., Panayotou G. y Kekos D. (2008).** Detoxification of 2,4-dichlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Phytochemistry* 69:707-714.
- Pi Y., Zhang L. y Wang J. (2007).** The formation and influence of hydrogen peroxide during ozonation of para-chlorophenol. *Journal of Hazardous Materials* 141:707-712.
- Poulopoulos S. G., Korologos C. A., Boulamanti A. y Philippopoulos C. J. (2007).** Treatment of 2-chlorophenol aqueous solutions by wet oxidation. *Water Research* 41:1263-1268.
- Poulopoulos S. G., Nikolaki M., Karampetsos D. y Philippopoulos C. J. (2008).** Photochemical treatment of 2-chlorophenol aqueous solutions using ultraviolet radiation, hydrogen peroxide and photo-Fenton reaction. *Journal of Hazardous Materials* 153:582-587.
- Prakash S. M. y Gupta S. K. (2000).** Biodegradation of tetrachloroethylene in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Bioresource Technology* 72:47-54.
- Puhakka J. A., Melin E. S., Jarvinen K. T., Koro P. M., Rintala J. A., Hartikainen P., Shieh W. K. y Ferguson J. F. (1995).** Fluidized-bed biofilms for chlorophenol mineralization. *Water Science and Technology* 31(1):227-235.

- Puñal A. y Lema J. M. (1999).** Anaerobic treatment of Wastewater from a fish-canning factory in a full-scale Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor. *Water Science and Technology* 40(8):57-62.
- Qin J., Zhang Q. y Chuang K. T. (2001).** Catalytic wet oxidation of *p*-chlorophenol over supported noble metal catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental* 29:115-123.
- Qu J. (2008).** Research progress of novel adsorption processes in water purification: A review. *Journal of Environmental Sciences* 20:1-13.
- Qu X., Vavilin V. A., Mazéas L., Lemunier M., Duquennoi C., He P. -J. y Bouchez T. (2009).** Anaerobic biodegradation of cellulosic material: batch experiments and modelling based on isotopic data and focusing on aceticlastic and non-aceticlastic methanogenesis. *Waste Management* 29:1828-1837.
- Quan X., Shi H., Wang J. y Qian Y. (2003).** Biodegradation of 2,4-dichlorophenol in sequencing batch reactors augmented with immobilized mixed culture. *Chemosphere* 50:1069-1074.
- Quan X., Shi H., Liu H., Lv P. y Qian Y. (2004).** Enhancement of 2,4-dichlorophenol degradation in conventional activated sludge systems bioaugmented with mixed special culture. *Water Research* 38:245-253.
- Radehaus P. M. y Schmidt S. K. (1992).** Characterization of a novel *Pseudomonas* sp. that mineralizes high-concentrations of pentachlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2879-2885.
- Rajesh Banu J. y Kaliappan S. (2007).** Treatment of tannery wastewater using hybrid upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Journal of Environmental Engineering and Science* 6:415-421.
- Ramirez I., Volcke E. I. P., Rajinikanth R. y Steyer J. P. (2009).** Modeling microbial diversity in anaerobic digestion through an extended ADM1 model. *Water Research* 43:2787-2800.
- Rao A. G., Reddy T. S. K., Prakash S. S., Vanajakshi J., Joseph J. y Sarma P. N. (2007).** pH regulation of alkaline wastewater with carbon dioxide: A case study of treatment of brewery wastewater in UASB reactor coupled with absorber. *Bioresource Technology* 98:2131-2136.
- Rocheleau S., Greer C. W., Lawrence J. R., Cantin C., Laramée L. y Guiot S. R. (1999).** Differentiation of *Methanosaeta concilii* and *Methanosarcina barkeri* in anaerobic

- mesophilic granular sludge by fluorescent *in situ* hybridization and confocal scanning laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2222-2229.
- Rodríguez N. y Sanz J. L. (1998).** Response of an Anaerobic Granular Sludge to Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons in Different Conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86:226-232.
- Rodrigues A. C., Boroski M., Shimada N. S., Garcia J. C., Nozaki J. y Hioka N. (2008).** Treatment of paper pulp and paper mill wastewater by coagulation-flocculation followed by heterogeneous photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* 194:1-10.
- Rodríguez-Martínez J., Rodríguez-Garza I., Pedraza-Flores E., Balagurusamy N., Sosa-Santillan G. y Garza-García Y. (2002).** Kinetics of anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater in batch and upflow sludge blanket reactor. *Bioresource Technology* 85:235-241.
- Ruiz I., Veiga M. C., de Santiago P. y Blazquez R. (1997).** Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and an anaerobic filter. *Bioresource Technology* 60:251-258.
- Ruiz C., Torrijos M., Sousbie P., Lebrato Martínez J., Moletta R. y Delgenès J. P. (2002).** Treatment of winery wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor. *Water Science and Technology* 45(10):219-224.
- Rutgers M., Bogte J. J., Breure A. M. y Vanandel J. G. (1993).** Growth and enrichment of pentachlorophenol-degrading microorganisms in the nutristat, a substrate concentration-controlled continuous-culture. *Applied and Environmental Microbiology* 59:3373-3377.
- Rutgers M., Gooch D. D., Breure A. M. y Vanandel J. G. (1996).** Assessment of inhibition kinetics of the growth of strain P5 on pentachlorophenol under steady-state conditions in a nutristat. *Archives of Microbiology* 165:194-200.
- Sablania S. S., Goosena M. F. A., Al-Belushia R. y Wilfb M. (2001).** Concentration polarization in ultrafiltration and reverse osmosis: a critical review. *Desalination* 141:269-289.
- Sahinkaya E. y Dilek F. B. (2005).** Biodegradation of 4-chlorophenol by acclimated and unacclimated activated sludge - evaluation of biokinetic coefficients. *Environmental Research* 99:243-252.

- Sahinkaya E. y Dilek F. B. (2006a).** Effect of biogenic substrate concentration on 4-chlorophenol degradation kinetics in sequencing batch reactors with instantaneous feed. *Journal of Hazardous Materials* 137:282-287.
- Sahinkaya E. y Dilek F. B. (2006b).** Effect of biogenic substrate concentration on the performance of sequencing batch reactor treating 4-CP and 2,4-DCP mixtures. *Journal of Hazardous Materials* 128:258-264.
- Saiki Y., Iwabuchi C., Katami A. y Kitagawa Y. (2002).** Microbial analyses by fluorescence in situ hybridisation of well-settled granular sludge in brewery wastewater treatment plants. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93:601-606.
- Sanchez E., Montalvo S., Travieso L. y Rodriguez X. (1995).** Anaerobic digestion of sewage sludge in an anaerobic fixed bed digester. *Biomass & Bioenergy* 9:493-495.
- Sánchez I., Fernández N., Amils R. y Sanz J. L. (2008).** Assessment of the addition of *Thiobacillus denitrificans* and *Thiomicrospira denitrificans* to chemolithoautotrophic denitrifying bioreactors. *International Microbiology: the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 11:179-184.
- Sanford R. A., Cole J. R., Löffler F. E. y Tiedje J. N. (1996).** Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp nov, which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3800-3808.
- Sanford R. A., Cole J. R. y Tiedje J. M. (2002).** Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp nov., an aryl-halo-respiring facultative anaerobic myxobacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 68:893-900.
- Santegoeds C. M., Damgaard L. R., Hesselink G., Zopfi J., Lens P., Muyzer G. y de Beer D. (1999).** Distribution of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in anaerobic aggregates determined by microsensor and molecular analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4618-4629.
- Sanz J. L., Rodríguez N. y Amils R. (1997).** Effect of chlorinated aliphatic hydrocarbons on the acetoclastic methanogenic activity of granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47 :324-328.
- Sanz J. L., Culubret E., de Ferrer J., Moreno A. y Berna J. L. (2003).** Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biodegradation* 14 :57-64.

- Saravanan V. y Sreekrishnan T. R. (2008).** A mathematical model for a hybrid anaerobic reactor. *Journal of Environmental Management* 88:136-146.
- Sathishkumar M., Binupriya A. R., Kavitha D., Selvakumar R., Jayabalan R., Choi J. G. y Yun S. E. (2009).** Adsorption potential of maize cob carbon for 2,4-dichlorophenol removal from aqueous solutions: Equilibrium, kinetics and thermodynamics modelling. *Chemical Engineering Journal* 147:265-271.
- Sato T., Watanabe A., Hiyoshi N., Shirai M. e Itoh N. (2007).** Partial oxidation kinetics of m-hydroxybenzyl alcohol with noble metal catalysts in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* 43:295-302.
- Savant D. V., Abdul-Rahman R. y Ranade D. R. (2006).** Anaerobic degradation of adsorbable organic halides (AOX) from pulp and paper industry wastewater. *Bioresource Technology* 97:1092-1104.
- Schmidt L. M., Delfino J. J., Preston J. F. y St Laurent G. (1999).** Biodegradation of low aqueous concentration pentachlorophenol (PCP) contaminated groundwater. *Chemosphere* 38:2897-2912.
- Schumacher W., Holliger C., Zehnder A. J. y Hagen W. R. (1997).** Redox chemistry of cobalamin and ironsulfur cofactors in the tetrachloroethene reductase of *Dehalobacter restrictus*. *FEBS Letters* 409:421-425.
- Seghezzo L., Zeeman G., van Lier J. B., Hamelers H. V. M. y Lettinga G. (1998).** A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology* 65:175-190.
- Sekiguchi Y., Kamagata Y., Nakamura K., Ohashi A. y Harada H. (1999).** Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1280-1288.
- Seok J. (2003).** Hybrid adaptive optimal control of anaerobic fluidized bed bioreactor for the de-icing waste treatment. *Journal of Biotechnology* 102:165-175.
- Shannon M. A., Bohn P. W., Elimelech M. G., Mariñas J. G., Mayes B. J. y Anne M. (2008).** Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature* 452:301-310.
- Shen D. S., Liu X. W. y He Y. H. (2005).** Studies on adsorption, desorption and biodegradation of pentachlorophenol by the anaerobic granular sludge in an upflow

- anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Journal of Hazardous Materials* 125:231-236.
- Shen D. S., He R., Liu X. W. y Long Y. (2006).** Effect of pentachlorophenol and chemical oxygen demand mass concentrations in influent on operational behaviors of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Journal of Hazardous Materials* 136:645-653.
- Shima S., Warkentin E., Thauer R. K. y Ermler U. (2002).** Structure and function of enzymes involved in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and molecular hydrogen. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93:519-530.
- Shin H. y Kang S. (2003).** Performance and membrane fouling in a pilot scale SBR process coupled with membrane. *Water Science and Technology* 47:139-144.
- Shin Y. H., Shin N. C., Veriansyah B., Kim J. y Lee Y. W. (2009).** Supercritical water oxidation of wastewater from acrylonitrile manufacturing plant. *Journal of Hazardous Materials* 163:1142-1147.
- Shu H. -Y. y Chang M. -C. (2005).** Pilot scale annular plug flow photoreactor by UV/H₂O₂ for the decolorization of azo dye wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 125:244-251.
- Sikkema J., de Bont J. A. y Poolman B. (1995).** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59:201-222.
- Smidt H. y De Vos W. M. (2004).** Anaerobic microbial dehalogenation. *Annual Reviews of Microbiology* 58:43-73.
- Smidt H., Akkermans A. D. L., van der Oost J. y de Vos W. M. (2000).** Halorespiring bacteria-molecular characterization and detection. *Enzyme and Microbial Technology* 27:812-820.
- Smith M. H. y Woods S. L. (1994).** Regiospecificity of chlorophenol reductive dechlorination by vitamin B₁₂s. *Applied and Environmental Microbiology* 60:4111-4115.
- Somasiri W., Li X., Ruan W. -Q. y Jian C. (2008).** Evaluation of the efficacy of upflow anaerobic sludge blanket reactor in removal of colour and reduction of COD in real textile wastewater. *Bioresource technology* 99:3692-3699.

- Sossa K., Alarcón M., Aspé E. y Urrutia H. (2004). Effect of ammonia on the methanogenic activity of methylaminotrophic methane producing *Archaea* enriched biofilm. *Anaerobe* 10:13-18.
- Sowmeyan R. y Swaminathan G. (2008a). Evaluation of inverse anaerobic fluidized bed reactor for treating high strength organic wastewater. *Bioresource Technology* 99:3877-3880.
- Sowmeyan R. y Swaminathan G. (2008b). Performance of inverse anaerobic fluidized bed reactor for treating high strength organic wastewater during start-up phase. *Bioresource Technology* 99:6280-6284.
- Spain J. C. y Gibson D. T. (1988). Oxidation of substituted phenols by *Pseudomonas putida* F1 and *Pseudomonas* sp. strain JS6. *Applied and Environmental Microbiology* 54:1399-1404.
- Sponza D. T. (2001). Anaerobic granule formation and tetrachloroethylene (TCE) removal in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 29:417-427.
- Sponza D. T. (2002a). Tetrachloroethylene (TCE) removal during anaerobic granulation in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 37:213-236.
- Sponza D.T. (2002b). Simultaneous granulation, biomass retainment and carbon tetrachloride (CT) removal in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Process Biochemistry* 37:1091-1101.
- Sponza D. T. (2003). Toxicity and treatability of carbontetrachloride and tetrachloroethylene in anaerobic batch cultures. *International Biodeterioration and Biodegradation* 51:119-127.
- Sponza D. T. y Atalay H. (2003). Treatability of 2,4 dinitrotoluene in anaerobic/aerobic sequential processes. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 38:1529-1548.
- Sponza D. T. y Isik M. (2004). Decolorization and inhibition kinetic of Direct Black 38 azo dye with granulated anaerobic sludge. *Enzyme and Microbial Technology* 34:147-158.

- Sponza D. T. y Ulukoy A. E. (2005).** Treatment of 2,4-dichlorophenol (DCP) in a sequential anaerobic (upflow anaerobic sludge blanket) aerobic (completely stirred tank) reactor system. *Process Biochemistry* 40:3419-3428.
- Sponza D. T. y Ulukoy A. (2008).** Kinetic of carbonaceous substrate in an upflow anaerobic sludge sludge blanket (UASB) reactor treating 2,4 dichlorophenol (2,4 DCP). *Journal of Environmental Management* 86:121-131.
- Sreekanth D., Sivaramakrishna D., Himabindu V. y Anjaneyulu Y. (2009).** Thermophilic treatment of bulk drug pharmaceutical industrial wastewaters by using hybrid up flow anaerobic sludge blanket reactor. *Bioresource Technology* 100:2534-2539.
- Srivastava S. K. y Tyagi R. (1995).** Competitive adsorption of substituted phenols by activated carbon developed from the fertilizer waste slurry. *Water Research* 29:483-488.
- Stanlake G. J. y Finn R. K. (1982).** Isolation and characterization of a penta chloro phenol degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 44:1421-1427.
- Steiert J. G. y Crawford R. L. (1986).** Catabolism of pentachlorophenol by a *Flavobacterium* sp. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 141:825-830.
- Stergar V., Zagorc-Koncan J. y Zgajnar-Gotvanj A. (2003).** Laboratory scale and pilot plant study on treatment of toxic wastewater from the petrochemical industry by UASB reactors. *Water Science and Technology* 48(8):97-102.
- Stuart S. L. y Woods S. L. (1998).** Kinetic evidence for pentachlorophenol-dependent growth of a dehalogenating population in a pentachlorophenol- and acetate-fed methanogenic culture. *Biotechnology and Bioengineering* 57:420-429.
- Subramanyam R. y Mishra I. M. (2007).** Biodegradation of catechol (2-hydroxy phenol) bearing wastewater in an UASB reactor. *Chemosphere* 69:816-824.
- Suidan M.T., Flora J. R. V., Boyer T. K., Wuellner A. M. y Narayanan B. (1996).** Anaerobic dechlorination using a fluidized-bed GAC reactor. *Water Research* 30:160-170.
- Sun B. L., Cole J. R., Sanford R. A. y Tiedje J. M. (2000).** Isolation and characterization of *Desulfovibrio dechloracetivorans* sp nov., a marine dechlorinating bacterium growing by coupling the oxidation of acetate to the reductive dechlorination of 2-chlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2408-2413

- Sun W., Sierra-Alvarez R., Fernandez N., Sanz J. L., Amils R., Legatzki A., Maier R. M. y Field J. A. (2009). Molecular characterization and in situ quantification of anoxic arsenite-oxidizing denitrifying enrichment cultures. *FEMS Microbiology Ecology* 68:72-85.
- Susarla S., Masunaga S. y Yonezaw, Y. (1996). Reductive dechlorination pathways of chloro organics under anaerobic conditions. *Water Science and Technology* 34(5):489-494.
- Suthanthararajan R., Ravindranath E., Ramesh T., Chitra K., Umamaheswari B. y Rajamani S. (2006). Evaluation of sludge behavior in upflow anaerobic sludge blanket reactor for tannery wastewater treatment. *The Journal of the American Leather Chemists Association* 101:18-22.
- Switzenbaum M. S. (1983). Anaerobic fixed film wastewater treatment. *Enzyme and Microbial Technology* 5:242-250.
- Szewczyk R. y Długonski J. (2009). Pentachlorophenol and spent engine oil degradation by *Mucor ramosissimus*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63:123-129.
- Tagawa T., Syutsubo K., Sekiguchi Y., Ohashi A. y Harada H. (2000). Quantification of methanogen cell density in anaerobic granular sludge consortia by fluorescence in-situ hybridization. *Water Science and Technology* 42(3-4):77-82.
- Takeuchi R., Suwa Y., Yamagishi T. y Yonezawa Y. (2000). Anaerobic transformation of chlorophenols in methanogenic sludge unexposed to chlorophenols. *Chemosphere* 41:1457-1462.
- Talbot G., Topp E., Palin M. F. y Massé D. I. (2008). Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Research* 42:513-537.
- Tan I. A. W., Ahmad A. L. y Hameed B. H. (2009a). Adsorption isotherms, kinetics, thermodynamics and desorption studies of 2,4,6-trichlorophenol on oil palm empty fruit bunch-based activated carbon. *Journal of Hazardous Materials* 164:473-482.
- Tan I. A. W., Ahmad A. L. y Hameed B. H. (2009b). Fixed-bed adsorption performance of oil palm shell-based activated carbon for removal of 2,4,6-trichlorophenol. *Bioresource Technology* 100:1494-1496.
- Tartakovsky B., Levesque M. J., Dumortier R., Beaudet R. y Guiot S. R. (1999). Biodegradation of pentachlorophenol in a continuous anaerobic reactor augmented

- with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. Applied and Environmental Microbiology 65:4357–4362.
- Tartakovsky B., Manuel M. F., Beaumier D., Greer C. W. y Guiot S. R. (2001).** Enhanced selection of an anaerobic pentachlorophenol-degrading consortium. Biotechnology and Bioengineering 73:476-483.
- Taseli B. K. y Gokcay C. F. (2005).** Degradation of chlorinated compounds by *Penicillium camemberti* in batch and up-flow column reactors. Process Biochemistry 40:917-923.
- Tawfik A., Sobhey M. y Badawy M. (2008).** Treatment of a combined dairy and domestic wastewater in an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor followed by activated sludge (AS system). Desalination 227:167-177.
- Teer J. E., Leak D. J., Dudeney A. W. L., Narayanan A. y Stuckey D. C. (1997).** The treatment of iron oxalate leach liquors in a UASB with sulfate reduction. Water Science and Technology 36(6):383-390.
- Thuy Q. T. T. y Visvanathan C. (2006).** Removal of inhibitory phenolic compounds by biological activated carbon coupled membrane bioreactor. Water Science and Technology 53:89-97.
- Torkian A., Egbali A. y Hashemian S. J. (2003).** The effect of organic loading rate on the performance of UASB reactor treating slaughterhouse effluent. Resources, Conservation and Recycling 40:1-11.
- Trojanowicz M., Drzewicz P., Panta P., Gluszewski W., Nalecz-Jawecki G., Sawicki J., Sampa M. H. O., Oikawac H., Borrellyc S. I., Czaplickad M. y Szewczynska M. (2002).** Radiolytic degradation and toxicity changes in \pm c-irradiated solutions of 2,4-dichlorophenol. Radiation Physics and Chemistry 65:357-366.
- Tront J. M., Amos B. K., Loffler F. E. y Saunders F. M. (2006).** Activity of *Desulfitobacterium* sp strain Viet1 demonstrates bioavailability of 2,4-dichlorophenol previously sequestered by the aquatic plant Lemnaminor. Environmental Science and Technology 40:529-535.
- Tsezos M. y Bell J. P. (1989).** Comparison of the Biosorption and desorption of hazardous organic pollutants by live and dead biomass. Water Research 23:561-568.
- Tsuno H., Kawamura M. y Somiya I. (1996).** Anaerobic degradation of pentachlorophenol (PCP) in biological expanded-bed reactor. Water Science and Technology 34(5):335-344.

- Tugtas A. E., Tezel U. y Pavlostathis S. G. (2006).** An extension of the Anaerobic Digestion Model No. 1 to include the effect of nitrate reduction processes. *Water Science and Technology* 54(4):41-49.
- Tyler J. E. y Finn R. K. (1974).** Growth rates of a *Pseudomonad* on 2,4-D and 2,4 dichlorophenol. *Applied Microbiology* 28:181-184.
- Uotila J. S., Salkinoja-Salonen M. S., y Apajalahti J. H. (1991).** Dechlorination of pentachlorophenol by membrane bound enzymes of *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-I. *Biodegradation* 2:25-31.
- Utkin I., Woese C. y Wiegel J. (1994).** Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen-nov, sp-nov, an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44:612-619
- Utkin I., Dalton D. D. y Wiegel J. (1995).** Specificity of reductive dehalogenation of substituted ortho-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JWIU-DC1. *Applied and Environmental Microbiology* 61:346-351.
- Vallecillo A., Garcia-Encina P. A. y Pena M. (1999).** Anaerobic biodegradability and toxicity of chlorophenols. *Water Science and Technology* 40(8):161-168.
- van de Pas B. A., Smidt H., Hagen W. R., van der Oost J., Schraa G., Stams A. J. M. y de Vos W. M. (1999).** Purification and molecular characterization of ortho-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halo-respiration in *Desulfitobacterium dehalogenans*. *Journal of Biological Chemistry* 274:20287-20292.
- van de Pas B. A., Gerritse J., de Vos W. M., Schraa G. y Stams A. J. M. (2001).** Two distinct enzyme systems are responsible for tetrachloroethene and chlorophenol reductive dehalogenation in *Desulfitobacterium* strain PCE1. *Archives in Microbiology* 176:165-169.
- van Den Heuvel J. C. y Beftink H. H. (1988).** Kinetic effects of simultaneous inhibition by substrate and product. *Biotechnology and Bioengineering* 31:718-724.
- van Pée K. H. y Unversucht S. (2003).** Biological dehalogenation and halogenation reactions. *Chemosphere* 52:299-312.

- Vargas A., Moreno-Andrade I. y Buitron G. (2008).** Controlled backwashing in a membrane sequencing batch reactor used for toxic wastewater treatment. *Journal of Membrane Science* 320:185-190.
- Veeresh G. S., Kumar P. y Mehrotra I. (2005).** Treatment of phenol and cresols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. *Water Research* 39:154-170.
- Veriansyah B. y Kim J. D. (2007).** Supercritical water oxidation for the destruction of toxic organic wastewaters: A review. *Journal of Environmental Sciences* 19:513-522.
- Vidal G. y Diez M. C. (2005).** Methanogenic toxicity and continuous anaerobic treatment of wood processing effluents. *Journal of Environmental Management* 74:317-325.
- Vijayan P., Mahendiran C., Suresh C. y Shanthi K. (2009).** Photocatalytic activity of iron doped nanocrystalline titania for the oxidative degradation of 2,4,6-trichlorophenol. *Catalysis Today* 141:220-224.
- Villemur R., Lanthier M., Beaudet R. y Lépine F. (2006).** The *Desulfitobacterium* genus. *FEMS Microbiology Reviews* 30:706-733.
- Visvanathan C., Thu L. N., Jegatheesan V. y Anotai J. (2005).** Biodegradation of pentachlorophenol in a membrane bioreactor. *Desalination* 183:455-464.
- Wahab H. S., Bredow T. y Aliwi S. M. (2008).** Computational modeling of the adsorption and photodegradation of 4-chlorophenol on anatase TiO₂ particles. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 863:84-90.
- Wang S. J. y Loh K. C. (1999).** Facilitation of cometabolic degradation of 4-chlorophenol using glucose as an added growth substrate. *Biodegradation* 10:261-26.
- Wang Y.- T., Gabbard H. D. y Pai P.- C. (1991).** Inhibition of acetate methanogenesis by phenols. *Journal of Environmental Engineering* 117:487-500.
- Wang S. -J., Loh K. -C. y Chua S. S. (2003).** Prediction of critical cell growth behavior of *Pseudomonas putida* to maximize the cometabolism of 4-chlorophenol with phenol and sodium glutamate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology* 32:422-430.
- Wang S. -L., Tzou Y. -M., Lu Y. -H. y Sheng G. (2007a).** Removal of 3-chlorophenol from water using rice-straw-based carbon. *Journal of Hazardous Materials* 147:313-318.
- Wang S. G., Liu X. W., Zhang H. Y., Gong W. X., Sun X. F. y Gao B. Y. (2007b).** Aerobic granulation for 2,4-dichlorophenol biodegradation in a sequencing batch reactor. *Chemosphere* 69:769-775.

- Wittmann C., Zeng A. P. y Deckwer W. D. (1998). Physiological characterization and cultivation strategies of the pentachlorophenol-degrading bacteria *Sphingomonas chlorophenolica* RA2 and *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 21:315-321.
- Wu J. y Yu H. -Q. (2007). Biosorption of 2,4-dichlorophenol by immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions. *Bioresource Technology* 98:253-259.
- Wu W. M., Bhatnagar L. y Zeikus J. G. (1993). Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology* 59:389-397.
- Xue X., Hanna K., Abdelmoula M., Deng N. (2009). Adsorption and oxidation of PCP on the surface of magnetite: Kinetic experiments and spectroscopic investigations. *Applied Catalysis B, Environmental* 89:432-440.
- Yang M., Zhang Y., Qi R., Uesugi K. y Myoga H. (2001). Improved O₃/H₂O₂ oxidation process for wastewater reclamation. *Water Science and Technology* 43(10):311-318.
- Yang C. F., Lee C. M. y Wang C. C. (2005a). Degradation of chlorophenols using pentachlorophenol-degrading bacteria *Sphingomonas chlorophenolica* in a batch reactor. *Current Microbiology* 51:156-160.
- Yang Y., Pesaro M., Sigler W. y Zeyer J. (2005b). Identification of microorganisms involved in reductive dehalogenation of chlorinated ethenes in an anaerobic microbial community. *Water Research* 39:3954-3966.
- Yang X., Bai M. y Han F. (2009). Treatment of phenol wastewater using hydroxyl radical produced by micro-gap discharge plasma technique. *Water Environment Research* 81(4):450-455.
- Ye F. -X. y Shen D. S. (2004). Acclimation of anaerobic sludge degrading chlorophenols and the biodegradation kinetics during acclimation period. *Chemosphere* 54:1573-1580.
- Ye F. -X., Shen D. S. y Feng X. S. (2004). Anaerobic granule development for removal of pentachlorophenol in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Process Biochemistry* 39:1249-1256.
- Ye F. -X. y Li Y. (2007). Biosorption and biodegradation of pentachlorophenol (PCP) in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Biodegradation* 18:617-624.

- Yin X., Bian W. y Shi J. (2009).** 4-chlorophenol degradation by pulsed high voltage discharge coupling internal electrolysis. *Journal of Hazardous Materials* 166:1474-1479.
- Yoon H., Klinzing G. y Blanch H. W. (1977).** Competition for mixed substrates by microbial populations. *Biotechnology and Bioengineering* 19: 1193-1210.
- Yu S. y Semprini L. (2004).** Kinetics and modeling of reductive dechlorination at high PCE and TCE concentrations. *Biotechnology and Bioengineering* 88:451-464.
- Zaiat M., Rodrigues J. A., Ratusznei S. M., de Camargo E. F. y Borzani W. (2001).** Anaerobic sequencing batch reactors for wastewater treatment: A developing technology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55:29-35.
- Zazo J. A., Casas J. A., Mohedano A. F., Gilarranz M. A. y Rodríguez J. J. (2005).** Chemical pathway and kinetics of phenol oxidation by Fenton's reagent. *Environmental Science and Technology* 39:9295-9302.
- Zazo J. A., Casas J. A., Molina C. B., Quintanilla A. y Rodríguez J. J. (2007).** Evolution of ecotoxicity upon Fenton's oxidation of phenol in water. *Environmental Science and Technology* 41:7164-7170.
- Zehnder A. J. B. y Colberg P. J. (1986).** Anaerobic biotransformation of organic carbon compounds. *FEMS Symposium*.
- Zhang X. y Wiegel J. (1990).** Sequential anaerobic degradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1119-1127.
- Zhang J., Liu X., Xu Z., Chen H. y Yang Y. (2008).** Degradation of chlorophenols catalyzed by laccase. *International Biodeterioration and Biodegradation* 61:351-356.
- Zhang J., Xu Z., Chen H. y Zong Y. (2009a).** Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*. *Biochemical Engineering Journal* 45:54-59.
- Zhang W., Xie Q., Rouse J. D., Qiao S. and Furukawa K. (2009).** Treatment of high-strength corn steep liquor using cultivated Polyvinyl alcohol gel beads in an anaerobic fluidized-bed reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107:49-53.
- Zhang Y., Rodionov D. A., Gelfand M. S. y Gladyshev V. N. (2009).** Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B12 utilization. *BMC Genomics* 10:78.

- Zheng P. y Hu B. (2002).** Start-up strategies of UASB reactor for treatment of pharmaceutical wastewater. *Journal of Environmental Sciences (China)* 14:250-254.
- Zilouei H., Guieysse B. y Mattiasson B. (2006).** Biological degradation of chlorophenols in packed-bed bioreactors using mixed bacterial consortia. *Process Biochemistry* 41:1083-1089.
- Zouari H., Labat M. y Sayadi S. (2002).** Degradation of 4-chlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures. *Bioresource Technology* 84:145-150.
- Zoutberg G. R. y Frankin R. (1996).** Anaerobic treatment of chemical and brewery waste water with a new type of anaerobic reactor; the biobed® EGSB reactor. *Water Science and Technology* 34(5-6):375-381.

Libros

- APHA/AWWA/WPCF. (1992).** Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 1ª Edición. Ediciones Díaz de Santos. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation. Madrid. Spain.
- Batstone D. J., Keller J., Angelidaki I., Kalyuzhnyi S. V., Pavlostathis S. G., Rozzi A., Sanders W. T. M., Siegrist H. y Vavilin V. A. (2002).** Anaerobic Digestion Model No. 1. International Water Association (IWA) Publishing. Londres. RU.
- Bermúdez J. J., Cánovas M., Manzón A., Iborra J. L. y Howell J. A. (1998).** La digestión anaerobia. Universidad de Murcia. España.
- Castillo F. y Roldán M. D. (2005).** Biotecnología ambiental. Editorial Tebar. Madrid. España.
- Edeline J. (1980).** Reacteurs anaerobies (digesterus). In: L'Épuration Biologique des Eaux Residuaires. Theorie et Technology. 207-253. Cebedoc. Liege. Bélgica.
- Gadd G. M. (2001).** Fungi in bioremediation. Cambridge University Press. Cambridge. RU.
- Grady C. P. L. y Lim H. C. (1999).** Biological Waste Treatment: Theory and Applications. Marcel Dekker. Nueva York. EUA.
- Haldane J. B. S. (1930).** Enzymes. Longmans. Londres. RU.
- Hulshoff Pol L.W., Heijnekamp K. y Lettinga G. (1988).** The selection pressure as a driving force behind the granulation of anaerobic sludge. In: Lettinga G., Zehnder A. J. B., Grotenhuis J. T. C. and Hulshoff Pol L.W., editors. Proceedings of the GASMAT Workshop Granular anaerobic sludge; microbiology and technology. Wageningen. Holanda. 153-161.
- Katadis D. y Gordan G. (1987).** Mechanisms of Inorganic Reactions. Wiley. Nueva York. EUA.
- McCarty P. L. (1966).** Kinetics of waste assimilation in anaerobic treatment. In: Developments in Industrial Microbiology. American Institute of Biological Sciences. Washington DC. EUA.
- Núñez de Castro (2001).** Enzimología. Ediciones Pirámide. Grupo Anaya. Madrid. España.
- Parés R. y Juárez A. (1997).** Bioquímica de los microorganismos Reverté. Madrid. España.

- Prescott L. M., Harley J. P. y Klein D. A. (1999).** Microbiología. Editorial Mc Graw Hill. Madrid. España.
- Radrigan P., Versprille A. I. y Korthout H. P. (2002).** High rate anaerobic treatment for bakery yeast wastewater in Chile. Proceedings of poster presentations of the 7th Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion. 22-25 Octubre 2002. Mérida. México. 353-356.
- Ramalho R. S. (1991).** Tratamiento de aguas residuales. Editorial Reverté. Barcelona. España.
- Rodríguez F. C., y Roldán M. D. (2005).** Biotecnología ambiental. Ruiz Editorial Tébar. Madrid. España.
- Speece R. E. (1996).** Anaerobic Biotechnology For Industrial Wastewaters. Editorial Archaeas Press. Vanderbilt University. Nashville. Tennessee. EUA.
- Sppeding G. (Editor) (1990).** Ribosomes and protein synthesis: a practical approach. Oxford University Press. EUA.
- Stahl D. y Amann R. I. (1991).** Development and Application of Nucleic Acid Probes in Bacterial Systematics. In: Sequencing and Hybridization Techniques in Bacterial Systematics. Eds Stackebrandt E., Goodfellow M. Wiley. Chichester. RU. 205-248.
- Stronach S. M., Rudd T. y Lester J. N. (1986).** Anaerobic digestion processes in industrial wastewater treatment. Springer-Verlag. Berlin. Alemania.

Tesis doctorales

- Bautista P.** (2008). Tratamiento de aguas residuales de la industria cosmética mediante el proceso Fenton y con el sistema $\text{Feg-Al}_2\text{O}_3\text{H}_2\text{O}_2$. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Calvo L.** (2004). Empleo de carbones activos como soportes catalíticos para la hidrodecloración de clorofenoles en aguas. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Díaz E.** (2003). Ecología molecular de la comunidad microbiana del lodo granular de reactores anaerobios. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Méndez Paz D.** (2002). Biodegradación anaerobia de compuestos tóxicos en aguas residuales industriales. PhD Thesis. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- van Eekert M.** (1999). Transformation of chlorinated compounds by methanogenic granular sludge. PhD Thesis. Wageningen University. Holanda.

